

**Über den Mechanismus der selektiven Wirkung
von synthetischen Antidiarrhoika
auf enterale Opiatrezeptoren**

Michael Wüster

1978

Über den Mechanismus der selektiven Wirkung
von synthetischen Antidiarrhoika
auf enterale Opiatrezeptoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Chemie/Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt

von

Michael Wüster

München 1978



- | | |
|----------------------|--------------------|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. A. Herz |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. F. Eiden |

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 5. 1978

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
Zusammenfassung	4
<u>1. Einleitung</u>	6
1.1. Opiate - Narkotische Analgetika	6
1.2. Chemie der Antidiarrhoika	8
1.3. Darmspezifische Wirkung von Opiaten	11
1.3.1. Wirkort	11
1.3.2. Mechanismus	11
1.4. Problemstellung	12
<u>2. Ergebnisse</u>	14
2.1. Radiorezeptorassay	14
2.1.1. "Opiatrezeptoren"	14
2.1.2. Darstellung der Rezeptor- besetzung in Bindungsstudien	15
2.1.3. Rezeptoraffinitäten im Ratten- gehirn	20
2.1.4. Natriumquotient	21
2.1.5. Rezeptoraffinitäten im Plexus Myentericus	22
2.1.6. Korrelation mit in vivo Ergebnissen	24
2.2. Experimente am isolierten Organ	25
2.2.1. Das isolierte Meerschweinchenileum	25
2.2.2. Die Untersuchung von Opiaten am isolierten Organ	26
2.2.3. Eigenschaften, durch die sich die Wirkung der Antidiarrhoika von der der narkotischen Analgetika unterscheidet	27

2.2.4. Korrelation mit der Rezeptor-	
affinität	29
2.2.5. Akkumulation der Substanzen im	
Gewebe	31
2.3. Antinozizeptive Effekte in Nagetieren	35
2.3.1. Vorbemerkungen	35
2.3.2. Wirkung nach intravenöser	
Injektion	36
2.3.3. Wirkung nach intraventrikulärer	
Injektion	38
2.4. Pharmakokinetik	40
2.4.1. Einfluß auf die Wirkung von	
Opiaten	40
2.4.2. Befunde aus anderen Untersuchungen	40
2.4.3. Pharmakokinetik von Loperamid und	
Morphin	42
2.4.4. Metabolisierung	44
2.5. Physiko-chemische Eigenschaften	48
2.5.1. Vorbemerkungen	48
2.5.2. Verteilungskoeffizient	50
2.5.3. Plasmaproteinbindung	51
2.5.4. Grenzflächenaktivität	52
2.6. Unspezifische Bindung von ^3H -Loperamid	
an Gewebehomogenat	55
2.6.1. Rezeptorbindungsstudien mit	
^3H -Loperamid	55
2.6.2. Vergleich der unspezifischen	
Bindung von Etorphin - Fentanyl -	
Loperamid	59
2.6.3. Charakterisierung der ^3H -Loperamid-	
bindung durch Tenside	62

3. Diskussion

<u>4. Experimenteller Teil</u>	70
4.1. Verwendete Materialien und Substanzen	70
4.2. Apparate, Geräte, Hilfsmittel	72
4.2.1. Radiorezeptorassay	72
4.2.2. Längsmuskelpräparation	72
4.2.3. Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften	72
4.2.4. Sonstiges	73
4.2.5. Tiere	74
4.3. Methoden	74
4.3.1. Radiorezeptorassay	74
4.3.2. Präparation des isolierten Organs	75
4.3.3. Messung der antinozizeptiven Effekte	76
4.3.4. Pharmakokinetik	77
1. Gesamtaktivitäten	77
2. unveränderte Substanz	77
4.3.5. Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften	78
1. Verteilungskoeffizient	78
2. pK-Wert	78
3. Plasmaproteinbindung	79
4. Grenzflächenaktivität	79
4.3.6. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	80
<u>5. Literaturverzeichnis</u>	81

Zusammenfassung

Synthetische Antidiarrhoika zeichnen sich durch eine opiatartige obstipierende Wirkung bei weitgehendem Fehlen morphinomimetischer Wirkungen auf das Zentralnervensystem aus. Es war Aufgabe der vorliegenden Arbeit, Ursache und Mechanismus der selektiven Beeinflussung der Darmfunktion durch diese Substanzen zu untersuchen.

1. Die Antidiarrhoika vermögen in gleicher Weise wie narkotische Analgetika radioaktiv markierte Opiate aus der stereospezifischen Rezeptorbindung in Membranpräparationen zu verdrängen. Die für beide Substanzgruppen bestimmten Rezeptoraffinitäten liegen in einer ähnlichen Größenordnung. Auch in Hinblick auf die Verminderung der Affinität durch Natriumionen verhalten sich beide Substanzklassen gleich.
2. Als eine mögliche Ursache der selektiven Wirkung wurde eine spezielle Interaktion der Antidiarrhoika mit den Opiatrezeptoren des Darmes erwogen. Eine vergleichende Untersuchung der beiden Substanzklassen in Hinblick auf ihre stereospezifische Bindung an Hirn- und Darmrezeptoren ergab jedoch weitgehend identische Affinitäten.
3. Als weitere Ursache der selektiven Wirkung der Antidiarrhoika wurde eine spezielle Verteilung im Organismus in Betracht gezogen und zu diesem Zwecke die Pharmakokinetik von radioaktiv markiertem Loperamid und Morphin an der Maus untersucht. Loperamid wurde nach intravenöser Injektion sehr schnell aus dem Blut eliminiert. Im Zentralnervensystem

werden nur sehr kleine Substanzmengen gefunden. Dies erklärt, daß selbst bei intravenöser Injektion zentrale morphinomimetische Wirkungen nur nach Applikation hoher, subtoxischer Dosen beobachtet wurden.

4. Die Verteilungsstudie zeigte eine Akkumulation von Loperamid in der Darmwand. Es wird vermutet, daß hierbei die bei den Antidiarrhoika gefundene Oberflächenaktivität eine wesentliche Rolle spielt.
5. Bei Untersuchungen am isolierten Meerschweinchendarm zeigten die Antidiarrhoika ein von den narkotischen Analgetika abweichendes Verhalten, welches durch die Grenzflächenaktivität dieser Substanzen erklärt wird. Damit in Zusammenhang stehen dürfte die in diesem Gewebe unter in vitro Bedingungen beobachtete Akkumulation der Antidiarrhoika.
6. Ein besonderes Verhalten der Antidiarrhoika zeigten auch Bindungsstudien mit ^3H -Loperamid an Membranpräparationen. Hierbei ließ sich neben der spezifischen Bindung an den Opiatrezeptor eine charakteristisch unspezifische Bindung des Loperamids nachweisen.

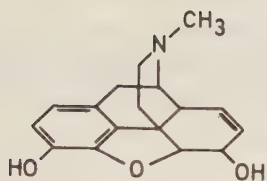
Aus diesen verschiedenartigen Befunden wird geschlossen, daß die Antidiarrhoika sich in unmittelbarer Umgebung der Opiatrezeptoren anreichern. In Zusammenhang mit der besonderen Kinetik der Substanzen wird dies als Erklärung für die selektive Darmwirksamkeit der Antidiarrhoika angesehen.

1. EINLEITUNG

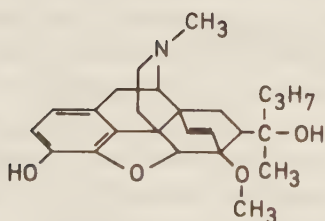
1.1 Opiate - Narkotische Analgetika

Opium, das aus dem Milchsaft von "Papaver somniferum" gewonnen wird, ist mit seinen Effekten wahrscheinlich schon den Sumerern (4000 v.Chr.) bekannt gewesen. Es enthält als Wirkstoff zwei pharmakologisch deutlich unterscheidbare Klassen von Alkaloiden, die Phenanthrene (Morphin, Codein, Thebain) und die Benzylisochinoline (Papaverin, Noscapin). Insgesamt machen die Alkaloide etwa 25% des Opiumgewichtes aus, davon Morphin als wichtigstes Phenanthrenalkaloid ca. 10% (Jaffe und Martin, 1975).

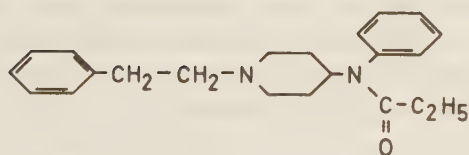
Morphin wurde, als erstes Alkaloid überhaupt, 1803 von dem Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner isoliert, es dauerte dann allerdings noch über 100 Jahre bis 1925 von Robinson und Gulland die chemische Struktur aufgeklärt wurde (Abb. 1). In der Folgezeit ist eine Vielzahl von ähnlich wirkenden halb- oder vollsynthetischen Opiaten entdeckt worden, die z.T. bis zu 10.000 mal stärker wirksam sind als Morphin. Opiate sind wegen ihres einzigartigen Effektes auf das ZNS als Analgetika unentbehrlich, indem sie auch stärkste Schmerzen bekämpfen, ohne daß der Patient in anderen Sinneswahrnehmungen merklich beeinträchtigt wird. Unter den vielen weiteren Effekten, die von den Opiaten verursacht werden, ist die antidiarrhoische Wirkung wohl die wichtigste. Lange bevor man Opium als Analgetikum benutzte, wurde es als obstipierendes Mittel bei Ruhr und Durchfall angewendet. Den konstipierenden Effekt zeigen alle narkotischen Analgetika, und fast immer sind dafür erheblich kleinere Dosen nötig als zur Schmerzbekämpfung (Jaffe und Martin, 1975).



MORPHIN



ETORPHIN



FENTANYL

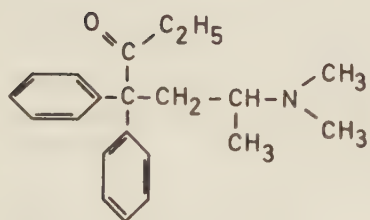
Einer weiten Verbreitung der Opiate in der Therapie der Diarrhoe stehen allerdings die schwerwiegenden Nebenwirkungen der Substanzen entgegen, wie z.B. die schnelle Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit. Man hat deshalb mit Nachdruck nach Stoffen gesucht, die die antidiarrhoische Wirkung von den anderen, zentralen Opiateffekten trennen.

1.2. Chemie der Antidiarrhoika

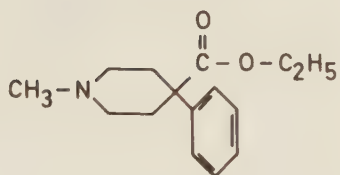
Als synthetische Antidiarrhoika werden allgemein Substanzen bezeichnet, die selektiv eine opiatartige Obstipation verursachen. Diese Stoffklasse wurde während der Untersuchung verschiedener narkotischer Analgetika vom Methadon- und Pethidin-Typ gefunden (Abb. 2). Als Prototyp dieser Serie von Hybridmolekülen wurde das Diphenoxylat [Äthyl 1-(3-cyano-3,3-diphenylpropyl)-4-phenyl-4-piperidincarboxylat HCl] in die Therapie eingeführt (Reasec^R) (Janssen et al., 1959). Die eigentliche Wirkung wird jedoch hauptsächlich von dessen aktiven Metaboliten Difenoxin verursacht (van Wijngaarden und Soudijn, 1972). Therapeutisch angewendet zeigen diese Substanzen nach oraler Applikation eine selektiv antidiarrhoische Wirkung, mit höheren Dosen lassen sich jedoch opiatartige zentrale Effekte erreichen (Jaffe und Martin, 1975).

Kürzlich wurde die Entwicklung von Antidiarrhoika mit höherer Aktivität und Selektivität berichtet (Stokbroekx et al., 1973). Loperamid [4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxi-N,N-dimethyl- α,α -diphenyl-1-piperidinbutanamid HCl, Imodium^R] und Fluperamid sind von der chemischen Struktur her mit dem Neuroleptikum Haloperidol verwandt; es wurde gezeigt, daß sich mit diesen Substanzen morphino-

METHADON



PETHIDIN



DIPHENOXYLAT

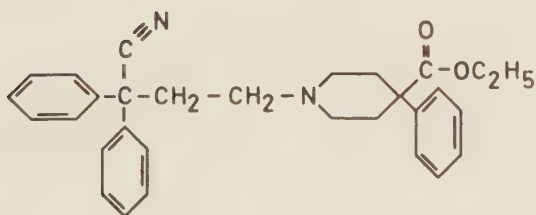
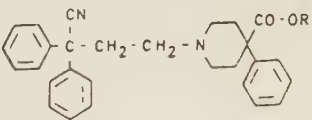
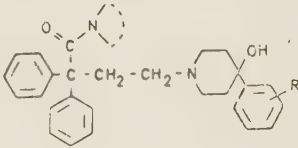


Abb. 2

mimetische Effekte im ZNS nur nach Gabe von toxischen oder subtoxischen Dosen erreichen lassen (Niemegeers et al., 1974).

Tabelle 1

Synthetische Antidiarrhoika

a)			
Diphenoxylat	R	CH ₂ CH ₃	
Difenoxin		H	
b)			
	-N<	R	
Loperamid	N(CH ₃) ₂		4-Cl
Fluperamid	N(CH ₃) ₂	3-CF ₃ ,	4-Cl
R 21345	NH ₂		4-Cl
R 20905	NHCH ₃		4-Cl
R 18936	N(CH ₃) ₂		H
R 18861	NC ₅ H ₁₀		H

Die vorliegende Arbeit behandelt als synthetische Antidiarrhoika nur Substanzen mit den oben beschriebenen Strukturen (Tab. 1), andere Stoffe mit darmspezifischer Wirkung, wie z.B. das 1-Amino-3-(3-dialkylaminoalkyl)-3-phenyloxindol (Butler et al., 1973) die bisher nur in der Patentliteratur beschrieben wurden, und für die keine klinischen Untersuchungen bekannt sind, wurden nicht berücksichtigt.

1.3. Darmspezifische Wirkung von Opiaten

1.3.1. Wirkort

Die Frage nach der Lokalisation der antidiarrhoischen Wirkung der Opiate ist nicht zweifelsfrei geklärt. Auf Grund der allgemein starken zentralen Wirkung von Morphin vermuten eine Reihe von Autoren, daß der Effekt teilweise (Weinstock, 1971) oder überwiegend (Reynolds und Randall, 1957; Margolin und Plekks, 1965) im Gehirn ausgelöst wird. Dabei sind sowohl eine nervöse wie auch humorale Steuerung der Darmperistaltik durch das ZNS angenommen worden.

Es ist jedoch wahrscheinlicher, daß die Morphin-Obstipation lokal durch Besetzung spezifischer Rezeptoren im Nervengewebe des Verdauungstraktes vollbracht wird (Rinaldo et al., 1971; Dajani et al., 1975; Burks, 1976). Eigene orientierende Versuche, die eine mögliche Beeinflussung der Darmmotorik durch freigesetzte Endorphine nach intraventrikulärer Injektion von Morphin untersuchten, ergaben keinen Anhalt für eine derartige zentrale Steuerung (Wüster, unveröffentlicht).

Es handelt sich also bei der antidiarrhoischen Wirkung des Morphins wahrscheinlich um einen peripher ausgelösten Effekt, und es gibt wenig Anhalt, einen anderen Mechanismus für die hier getesteten Antidiarrhoika anzunehmen.

1.3.2. Mechanismus

Die Einwirkung von Opiaten auf spezifische Rezeptoren im Nervengewebe des Verdauungstraktes führt zur Obstipation.

Der Wirkungsmechanismus ist allerdings nicht identisch in allen Spezies: am isolierten Ileum des Meerschweinchens erhält man nach Gabe von Morphin eine Hemmung des durch elektrische Stimulation freigesetzten Azetylcholins, Opiate bewirken hier also eine Muskeler schlaffung (siehe auch 2.2.1). In den meisten anderen Tierarten und beim Menschen hat Morphin einen exzitatorischen Effekt: evtl. durch Freisetzung von endogenem Serotonin (Burks und Long, 1967; De Oliveira und Bretas, 1973) erhöhen die Opiate die Kontraktionen der Ringmuskulatur und verlangsamen so die Passage des Darminhaltes. Die Wirkung auf den Längsmuskel ist gering (Vaughan Williams und Streeten, 1950; Bass und Wiley, 1965; Dajani et al., 1975).

1.4. Problemstellung

Durch die Entwicklung von Opiaten mit hoher Rezeptoraffinität und die Möglichkeit, diese sehr hoch radioaktiv zu markieren, wurde es möglich, das Vorhandensein spezifischer Bindungsstellen für diese Substanzen zu zeigen. Ausgehend von der Stereospezifität der Bindung, gelang es 1973 verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, Opiatrezeptoren im Nervengewebe zu demonstrieren (siehe 2.1.). Daß es sich dabei um die pharmakologisch relevante Rezeptorbindung handelt, ist wahrscheinlich. So sind die Rezeptoraffinitäten einer Vielzahl von Narkotika gut mit deren analgetischer Aktivität korrelierbar (Pert und Snyder, 1973b; Terenius, 1974).

Die Entwicklung von synthetischen Antidiarrhoika, also Substanzen, die eine starke opiatartige Wirkung auf den Darm von analgetischer Aktivität trennen, wirft die

Frage auf, ob und in welchem Maße diese Stoffe Rezeptoraffinität besitzen. Wenn die Antidiarrhoika eine Bindung an den Opiatrezeptor zeigen - eine Annahme, die auf Grund ihrer chemischen Struktur zulässig ist -, dann kann die selektive Wirkung in einer besonderen Rezeptorinteraktion dieser Substanzen begründet sein. Ebenso kann sie auch die Folge einer speziellen Verteilung im Körper darstellen, durch welche hauptsächlich die Rezeptoren erreicht werden, an denen ein konstipierender Effekt ausgelöst wird.

Als Ursache der selektiven Darmwirksamkeit der synthetischen Antidiarrhoika konnte also angenommen werden:

1. verschiedenartige Opiatrezeptoren, an denen die einzelnen Effekte ausgelöst werden,
2. spezifische Rezeptorinteraktion der Antidiarrhoika, evtl. eine besondere "intrinsic activity",
3. eine spezielle Pharmakokinetik.

Zur Untersuchung dieser Möglichkeiten wurden die Affinitäten verschiedener Antidiarrhoika und narkotischer Analgetika zu Opiatrezeptoren im ZNS und Darm bestimmt und mit der pharmakologischen Wirkung in vivo und in vitro korreliert. Die Pharmakokinetik wurde mittels radioaktiv markierter Substanzen bestimmt.

Erste Arbeiten, die über opiatartige Aktivitäten von Antidiarrhoika im Radiorezeptorassay (Terenius, 1975; Wüster et al., 1976; Mackerer et al., 1976) oder am isolierten Meerschweinchenileum berichten (Van Nueten et al., 1976), ergeben keinen Aufschluß über den Mechanismus der spezifischen Darmwirksamkeit.

2.1. Radiorezeptorassay

2.1.1. "Opiatrezeptoren"

Wie von J. N. Langley und P. Ehrlich schon zu Beginn dieses Jahrhunderts gefordert, muß man sich die Wirkung vieler Pharmaka als Ergebnis einer Reaktion mit speziellen, biologisch aktiven Zentren im Körper vorstellen, den Rezeptoren (siehe Goldstein et al., 1974). Die Annahme, daß es spezifische makromolekulare Gewebestrukturen sein müssen, an denen Opiate einen Effekt auslösen, scheint berechtigt: so zeigen die meisten Opiate eine gemeinsame, genau definierbare Grundstruktur, die "analghiphore Gruppe " (Janssen, 1968). Darüber hinaus sind einige Analgetika extrem potent, Etorphin oder Sufentanyl sind 5000-10000 mal stärker wirksam als Morphin. Sie verursachen damit Effekte bei geringeren Konzentrationen als z.B. LSD, welches allgemein als die Substanz mit der höchsten Wirksamkeit auf das ZNS gilt. Weiterhin ergeben minimale Veränderungen in der Molekülstruktur spezifische Antagonisten. Substanzen wie Naloxon (N-allyl-oxi-dihydromorphinon) besetzen den Rezeptor, ohne einen Effekt auszulösen, und verhindern so die Wirkung gleichzeitig anwesender Opiatagonisten. Schließlich zeigen die narkotischen Analgetika Stereospezifität, indem meist nur eines von zwei optisch aktiven Isomeren eine biologische Aktivität besitzt.

Auf dieser Tatsache beruht auch das von Goldstein et al. (1971) vorgeschlagene Konzept zur Demonstration der Pharmakon-Rezeptor Interaktion. Die pharmakologisch relevante Bindung der Opiate mußte, genau wie die analgetische Aktivität, stereospezifisch sein. Unter dieser Voraussetzung gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen, die

spezifische Bindung von Opiaten im Rattengehirn und Meerschweinchenileum nachzuweisen (Pert und Snyder, 1973a; Simon et al., 1973; Terenius, 1973). Obwohl Stereospezifität als alleiniges Kriterium der Rezeptorbesetzung nicht genügt (es wurde u.a. auch die stereospezifische Bindung von Opiaten an Glasfaserfilter demonstriert), konnte in einer Reihe nachfolgender Arbeiten gezeigt werden, daß man es hier tatsächlich mit der Bindung zum Rezeptor zu tun haben mußte: die Rezeptoraffinität der Opiate liegt im Bereich der in vivo im Gewebe erreichbaren Konzentrationen, die Bindung ist sättigbar und reversibel, und sie ist nur in Geweben demonstrierbar, in denen Opiate einen pharmakologischen Effekt zeigen.

Nachdem Morphin normalerweise im Körper nicht vorkommt, stellte sich natürlich die Frage nach dem Sinn dieser spezifischen Bindungsstellen. In der Tat konnten 1975 aus Schweinehirnen die Pentapeptide Methionin- und Leucin-Enkephalin als endogene Liganden des Opiatrezeptors isoliert werden (Hughes et al., 1975), weitere, längerkettige "Endorphine" wurden in der Hypophyse entdeckt (Teschemacher et al., 1975). Endogene Opiate mit z.Zt. noch unbekannter Struktur wurden außerdem nachgewiesen im Blut (Pert et al., 1976; Schulz et al., 1977), im Darm (Wüster, 1977) und im Harn (Schulz und Wüster, 1977). Über die physiologische Bedeutung dieses "opioiden Systems" können bisher nur Mutmaßungen angestellt werden.

2.1.2. Darstellung der Rezeptorbesetzung in Bindungsstudien

Zur Durchführung der Bindungsstudien wurde eine Methode benutzt, bei der der freie Ligand vom Ligand - Rezeptorkomplex mittels schneller Filtration durch Glasfaserfilter getrennt wird, entsprechend der Methode von

Pert und Snyder (1973a). Im Prinzip konkurriert hier ein hochmarkiertes Opiat (spez. Radioaktivität >1 Ci/mmol) mit steigenden Konzentrationen eines unmarkierten Inhibitors. Diese Verdrängung des markierten Tracers aus der spezifischen Bindung wird dann durch schnelle Filtration, d.h. Trennung des Gewebes von der wässrigen Phase, sichtbar gemacht. Trotz einer theoretischen Schwäche der Methode (man mißt nur die Verdrängung der radioaktiven Substanz, nicht aber die Rezeptorbesetzung des kalten Inhibitors) bietet das Verfahren den Vorteil, daß die zu bestimmenden Substanzen nicht markiert vorliegen müssen.

Die Rezeptoraffinitäten aller Substanzen wurden zuerst im Rattengehirn bestimmt. Dazu wurden Rattengehirne ohne Cerebellum unter Eiskühlung homogenisiert und mit dem entsprechenden Puffer eine 1%ige Suspension hergestellt. Aliquote Teile wurden dann bei 25°C mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors 5 Minuten vorinkubiert und, nach Zugabe der Tracersubstanz (^3H -Naloxon), weitere 15 Minuten inkubiert. In Vorversuchen war ermittelt worden, daß diese Zeit zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen den beiden Substanzen am Rezeptor ausreichend ist (Abb. 3). Danach wurden die Proben durch Glasfaserfilterscheiben unter Vakuum filtriert, und, zur Verminderung der unspezifisch im Gewebe gebundenen Substanz, 2 mal mit eiskaltem Puffer gespült. In dem auf dem Filter zurückgehaltenen Gewebe wurde die Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt.

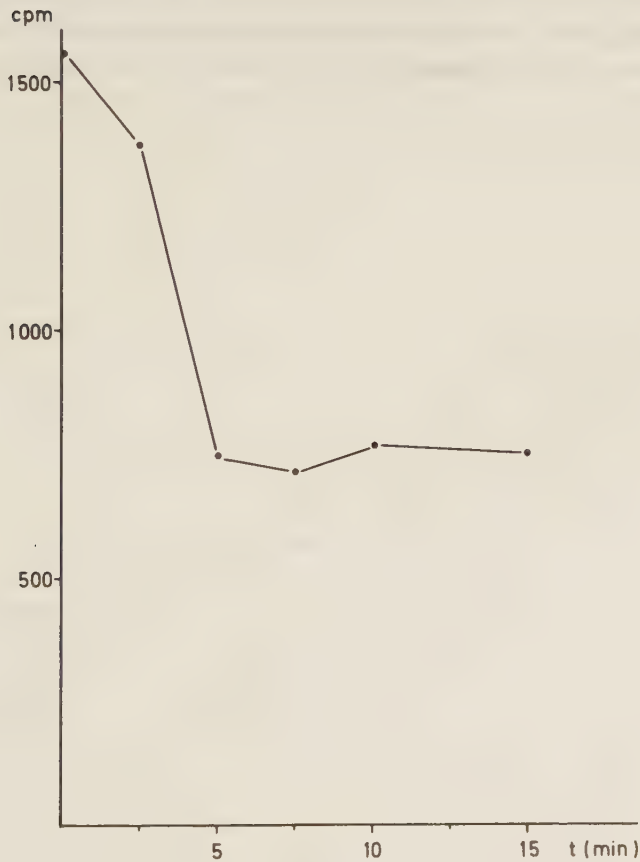


Abb. 3 Zeitverlauf der Hemmung der ^3H -Naloxonbindung im Rattengehirnhomogenat. Nach 5 min Vorinkubation mit ^3H -Naloxon ($2.5 \times 10^{-9}\text{M}$) wurde Loperamid (10^{-8}M) als Inhibitor zugegeben. Ordinate: gebundenes ^3H -Naloxon (cpm); Abszisse: Inkubationszeit von Loperamid. Mittelwert aus 2 Versuchen.

Das Ergebnis eines typischen Experiments zeigt Abb. 4: steigende Konzentrationen von Naloxon vermindern die gebundene Menge an ^3H -Naloxon bis bei 10^{-6}M ein Plateau erreicht wird, auch höhere Naloxonkonzentrationen erniedrigen die Radioaktivität im Gewebe nicht mehr.

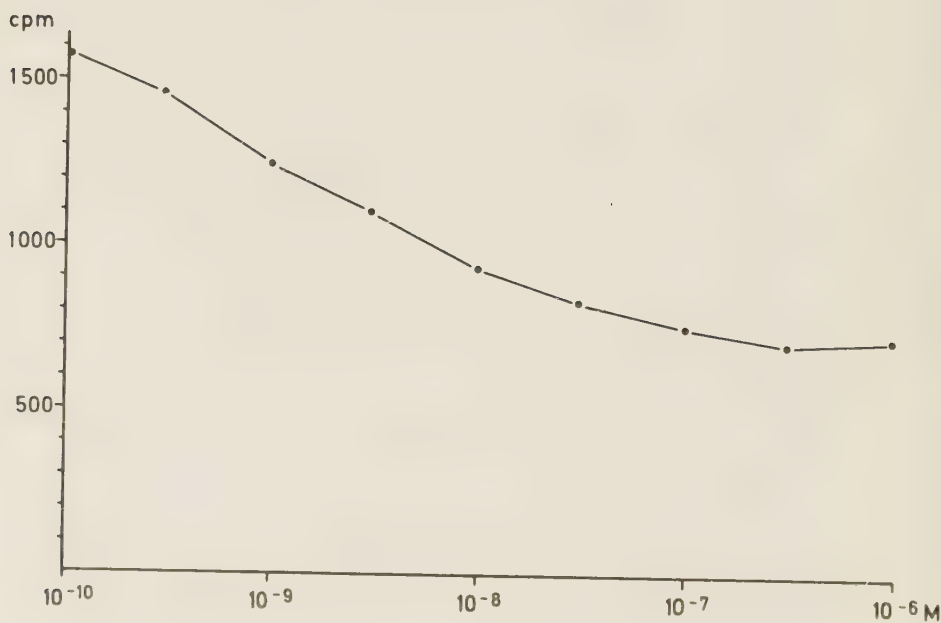


Abb. 4 Hemmung der Bindung von ^3H -Naloxon ($2.5 \times 10^{-9}\text{M}$) im Rattengehirnhomogenat durch steigende Naloxonkonzentrationen. Ordinate: gebundenes ^3H -Naloxon (cpm); Abszisse: Naloxonkonzentration.

Das deutet darauf hin, daß bei 10^{-6} M die markierte Substanz vollständig aus der spezifischen, sättigbaren Bindung verdrängt ist, die Restaktivität stellt also die in allen Proben etwa gleich große Menge Tracer dar, die unspezifisch im Gewebe und Filter verteilt ist.

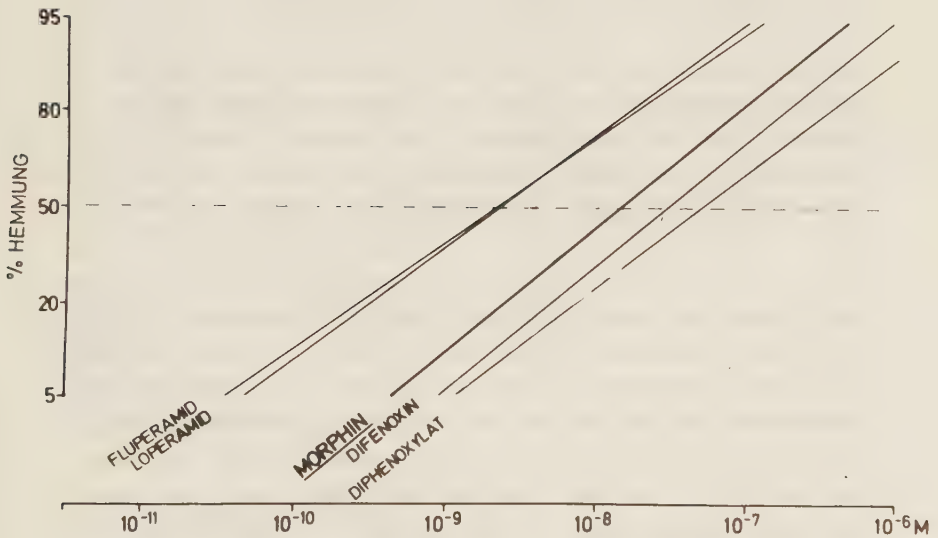


Abb. 5 Hemmung der Opiatrezeptorbindung von ^3H -Naloxon durch verschiedene Antidiarrhoika und Morphin. Darstellung im log-Wahrscheinlichkeitsnetz. Ordinate: Hemmung der stereospezifischen ^3H -Naloxonbindung ($2.5 \times 10^{-9}\text{M}$); Abszisse: Inhibitor-konzentration. Berechnung der jeweiligen Regressionsgraden aus den Ergebnissen von 5-6 Substanzkonzentrationen, Mittelwerte aus 4 Bestimmungen.

Stellt man die Ergebnisse der Verdrängung bei den verschiedenen Konzentrationen im Wahrscheinlichkeitsnetz, dar, so erhält man eine Gerade, aus der sich die 50%ige Verdrängung der markierten Substanz graphisch bestimmen läßt. Die Inhibitorkonzentration, die die stereospezifisch gebundene Substanz halb maximal hemmt, wird als Rezeptoraffinität (IC_{50}) bezeichnet.

2.1.3. Rezeptoraffinitäten im Rattengehirn

Die untersuchten Antidiarrhoika hemmen kompetitiv die stereospezifische Bindung von 3H -Naloxon, wie aus der Darstellung der Verdrängung im Wahrscheinlichkeitsnetz ersichtlich ist: die Steigungen sind gleich für Antidiarrhoika und narkotische Analgetika (Abb. 5).

Auch die Rezeptoraffinitäten dieser beiden Substanzklassen liegen im selben Bereich (Tab. 2), so zeigen Loperamid und Fluperamid in Tris Puffer eine ca. 7fach höhere Affinität als Morphin. Die beiden Hauptmetaboliten des Loperamids in der Ratte, das Mono- und Bidesmethylderivat, entsprechen R 21 345 und R 20 905 (Karim und Heykants, 1976); der für R 20 905 bestimmte Wert ist nahezu identisch mit dem für Loperamid. Die aktivste der getesteten Substanzen stellt R 18 936 dar, mit einer IC_{50} von 0.18 nM in Tris Puffer; gegenüber 0.19 nM für Etorphin als dem stärksten bekannten Analgetikum.

Diphenoxylat und Difenoxin, zwei Substanzen, deren chemische Struktur von dem 4-Aryl-4 hydroxipiperidinbutanamid-Gerüst abweicht, und deren antidiarrhoische Wirkung in vivo weniger stark und selektiv ist, sind auch weniger aktiv im Radiorezeptorassay, ihre Affinitäten liegen niedriger als die von Morphin.

Tabelle 2

Hemmung der stereospezifischen
³H-Naloxonbindung im Rattengehirnhomogenat

Substanz	Tris HCl Puffer	Tris HCl Puffer + 100 mM NaCl	Q <u>Tris HCl+NaCl</u> Tris HCl
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	
Loperamid	2.1	31	14.8
Fluperamid	2.4	10	4.2
R 21 345	38	280	7.4
R 20 905	2.8	42	15.0
R 18 936	0.18	2.3	12.8
R 18 861	3.8	46	12.1
Diphenoxylat	68	1180	17.3
Difenoxin	29	350	12.1
Morphin	14	160	11.4
Etorphin	0.19	0.76	4.0
Fentanyl	14.5	100	6.9

2.1.4. Natrium-Quotient

Es wurde gezeigt, daß die Rezeptoraffinitäten von Agonisten bei Anwesenheit physiologischer Kochsalzkonzentrationen im Inkubationsansatz (NaCl, 100 mM) herabgesetzt sind, die von Antagonisten werden leicht erhöht (Pert et al., 1973; Pert und Snyder, 1974). Simon et al. (1975) entwickelten daraufhin ein Modell des allosterischen Opiatrezeptors, wobei unter physiologischen Bedingungen der überwiegende Teil der Rezeptoren in der

"antagonistischen" Form vorliegt. Aus dem Verhältnis der Affinitäten in Anwesenheit/Abwesenheit von NaCl sollte man demnach den agonistischen bzw. antagonistischen Charakter einer Substanz erkennen können; so hat in diesem System der reine Antagonist Naloxon einen Quotienten von 1, der Agonist Morphin ca. 11. Für alle Antidiarrhoika dieser Untersuchung wurden die Rezeptoraffinitäten durch NaCl herabgesetzt (Tab. 2), der Quotient, der für Loperamid bestimmt wurde, entsprach etwa dem von Morphin.

In jüngster Zeit wurde die Aussagekraft dieses Quotienten allerdings wieder in Frage gestellt, für einige endogene Opiode, die pharmakologisch reine Agonisten darstellen, wurden Quotienten von 1 bis 2 bestimmt (Birdsall et al., 1976; Schulz et al., 1977).

2.1.5. Rezeptoraffinitäten im Plexus myentericus

Die Affinitäten der Substanzen zum Darmrezeptor wurden in einem Längsmuskelhomogenat des Meerschweinchenileums bestimmt (siehe 2.2.1.). Grundsätzlich entspricht die Methode dem in 2.1.2. beschriebenen Verfahren. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Versuchsbedingungen geringfügig geändert und denjenigen angenähert, unter denen die pharmakologische Wirkung am isolierten Organ bestimmt wurden (2.2.4.). Das Homogenat wurde mit Krebs-Ringer Tris Puffer hergestellt (Creese und Snyder, 1975), die Inkubationstemperatur betrug 37°C.

Es erwies sich, daß ^3H -Naloxon relativ stark unspezifisch im Muskelgewebe gebunden wurde, der Anteil der stereospezifisch gebundenen, und damit verdrängbaren Substanz,

war dementsprechend niedrig. Wir benutzten in diesen Versuchen deshalb das höher affine ^3H -Etorphin, das zudem noch höher radioaktiv markiert vorlag.

Die Rezeptoraffinitäten wurden parallel im Darm- und Gehirnhomogenat bestimmt, damit wurden möglicherweise auftretende Schwankungen zwischen einzelnen Versuchen ausgeschaltet. Es ergaben sich identische Werte in beiden Präparationen, sowohl für die narkotischen Analgetika wie auch für die Antidiarrhoika (Tab. 3). Allerdings liegt die Streuung der Ergebnisse bei den Versuchen mit Darmhomogenat etwas höher.

Tabelle 3

Rezeptoraffinitäten im Plexus myentericus im Vergleich zu den pharmakologischen Aktivitäten in der Ratte bei oraler Applikation

Substanz	Rezeptor- affinität Krebs-Ringer- Tris Puffer nM	ED ₅₀ " "castor oil test"	ED ₅₀ " "tail with- drawal reac- tion test"
Loperamid	25	0.15	160
Fluperamid	17	0.152	80
R 21 345	370	0.71	40
R 20 905	35	0.31	40
R 18 936	0.6	0.0115	4.3
R 18 861	50	0.256	320
Diphenoxylat	1050	0.15	12.8
Difenoxin	400	0.040	4.06
Morphin	100	1.52	33.6
Etorphin	0.5	nicht bekannt	
Fentanyl	60	0.19	0.42
**die Daten wurden der Veröffentlichung von Van Bower et al. (1976) entnommen.			

2.1.6. Korrelation mit in vivo Ergebnissen

Ein wichtiger Hinweis, daß es sich bei der im Radio-rezeptorassay demonstrierten Bindung um die Interaktion der Substanz mit der pharmakologisch relevanten Bindungsstelle handelt, erwächst aus der Tatsache der guten Korrelation der Rezeptoraffinitäten verschiedener Agonisten und Antagonisten mit ihrer entsprechenden Wirkung in vivo (Pert und Snyder, 1973b; Terenius, 1974; Wilson et al., 1975; Bläsig et al., 1976).

Es wurde untersucht, ob die Rezeptoraffinitäten der Antidiarrhoika mit deren antinozizeptiver oder antidiarrhoischer Wirkung zu korrelieren sind. Die Daten der oralen Wirksamkeit (bestimmt im "tail withdrawal"- und "castor oil"-Test) wurden der Veröffentlichung von Van Bever et al. (1976) entnommen (Tab. 3).

Bezieht man alle getesteten Antidiarrhoika in die Korrelation ein, dann ergibt sich weder eine Signifikanz für die analgetische ($r < 0.2$) noch für die antidiarrhoische Wirkung ($r = 0.2$). Werden jedoch nur die Werte der Piperidinbutanamide, nicht aber Diphenoxylat und Difenoxin für die Berechnung der Koeffizienten herangezogen, dann ist die Korrelation für die antidiarrhoische Wirkung hochsignifikant ($r = 0.95$, $p < 0.01$), für die analgetische nicht ($r = 0.21$).

Die völlig unterschiedlichen Korrelationskoeffizienten, die man je nach Auswahl der Substanzen erhält, deuten darauf hin, daß trotz der Gemeinsamkeit der selektiv antidiarrhoischen Wirkung sich die Gruppe der Piperidinbutanamide vom Diphenoxylat-Difenoxin in einem Faktor unterscheiden, der die Aktivität in vivo entscheidend beeinflusst.

2.2 Experimente am isolierten Organ

2.2.1 Das isolierte Meerschweinchenileum

Die Wirkung von Pharmaka am Ganztier ist u.a. abhängig von verschiedenen, schwer kontrollierbaren Faktoren, wie Resorption, Pharmakokinetik, Metabolisierung. Bei Untersuchungen an in-vitro Modellen kann man dagegen annehmen, daß diese Einflüsse weitaus geringere Bedeutung haben. Im Falle der narkotischen Analgetika und deren Antagonisten ist als isoliertes Organ das Meerschweinchenileum besonders intensiv untersucht worden: es handelt sich bei dieser Präparation um eines der wenigen peripheren Gewebe, an denen Opiate eine ähnliche Wirkung wie im ZNS haben, d.h. sie hemmen spezifisch die Übertragung von Impulsen (2.2.2.). Es wurde von anderen Autoren (Pert und Snyder, 1973a; Terenius, 1975) und hier (2.1.5.) gezeigt, daß im Nervengewebe dieses Organs spezifische Opiatrezeptoren vorhanden sind; auch die Enkephaline als endogene Liganden des Rezeptors wurden hier bereits nachgewiesen (Hughes et al., 1975; Elde et al., 1976; Schulz et al., 1977).

Histologisch besteht das Ileum hauptsächlich aus der Längs- und Zirkulärmuskulatur und der Mukosa. Die intramuralen Plexus bilden zwischen den beiden Schichten der glatten Muskulatur (Plexus Myentericus, Auerbach'scher Plexus) und in der Submukosa (Plexus submucosus, Meissner'scher Plexus) einen Teil des autonomen Nervensystems.

Zur Untersuchung von Opiaten wird nur selten das intakte Ileum als isoliertes Organ benutzt, experimentelle Vor- teile bietet die von Kosterlitz et al. (1970) eingeführte

"longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the guinea-pig ileum". Hierzu wird der Längsmuskel mit dem anhaftenden Plexus myentericus nach der Methode von Rang (1965) vom restlichen Ileum abgestreift. Dieses isolierte Organ, welches ausschließlich benutzt wurde, wird in der vorliegenden Arbeit als "Längsmuskelpräparation" bezeichnet.

2.2.2. Die Untersuchung von Opiaten am isolierten Organ

Die Längsmuskelpräparation, die sich unter physiologischen Bedingungen im Organbad befindet, zeigt in ihrem Ruhezustand keinerlei Effekt auf die Zugabe von Morphin, ebensowenig hat Morphin eine Wirkung auf Kontraktionen, die durch exogenes AcCH oder andere Muskelstimulantien (Histamin, Bradykinin) verursacht werden. Wird aber das isolierte Organ niederfrequent elektrisch stimuliert, so führt das durch die Freisetzung von endogenem AcCH zu einer Muskelkontraktion (Paton, 1955), die durch Opiate beeinflusst werden kann. Die Wirkungsstärke der Agonisten, die elektrisch induzierten Kontraktionen zu hemmen, oder der Antagonisten, diese Hemmung aufzuheben, zeigt dabei erstaunliche Übereinstimmungen mit deren pharmakologischer Potenz in vivo (Paton, 1957; Cox und Weinstock, 1966; Kosterlitz und Watt, 1968; Kosterlitz et al., 1973). Der Angriff der Opiate erfolgt postganglionär im Plexus myentericus, und wird durch eine Verminderung der freigesetzten AcCH-Menge verursacht (Gyang und Kosterlitz, 1966).

Auch andere Opiateffekte, wie sie nach chronischer Applikation im ZNS auftreten (Toleranz, Entzug), lassen sich an dieser Präparation demonstrieren, und der ihnen zugrunde-

liegende Mechanismus untersuchen (Goldstein und Schulz, 1973; Schulz und Herz, 1976).

Wie bereits in 1.3.2. beschrieben, stellt der inhibitorische Effekt der Opiate am Ileum des Meerschweinchens eine Besonderheit dieser Spezies dar. Die für die Antidiarrhoika an der Längsmuskelpräparation erhobenen Befunde können deshalb auch nicht als in vitro Korrelate einer spezifischen Darmwirksamkeit gesehen werden, vielmehr handelt es sich beim Meerschweinchenileum um ein Modell, an dem sich Opiat - Rezeptor Interaktionen darstellen lassen. Unter ähnlichen Voraussetzungen müssen Versuche gesehen werden, bei denen der Einfluß von Opiaten auf den peristaltischen Reflex des isolierten Meerschweinchenileums getestet wird (Trendelenburg, 1917; van Nueten et al., 1973).

2.2.3. Eigenschaften, durch die sich die Wirkung der Antidiarrhoika von der der narkotischen Analgetika unterscheidet

Die Hemmung der Muskelkontraktion, d.h. die Wirkung der Antidiarrhoika auf die Längsmuskelpräparation, ist opiatartig. So wird einerseits der Effekt dieser Substanzen durch den Morphinantagonisten Naloxon (100 nM) vollständig aufgehoben, andererseits kann ein Einfluß auf das Muskelgewebe ausgeschlossen werden, da sich die Empfindlichkeit der Präparation für exogenes AcCH bei Anwesenheit der Substanzen nicht verändert.

Dennoch zeigen die Antidiarrhoika in ihrer Wirkung einige spezifische Charakteristika: so brauchen diese Substanzen erheblich länger (ca. 30 Minuten) als Morphin, bis sie

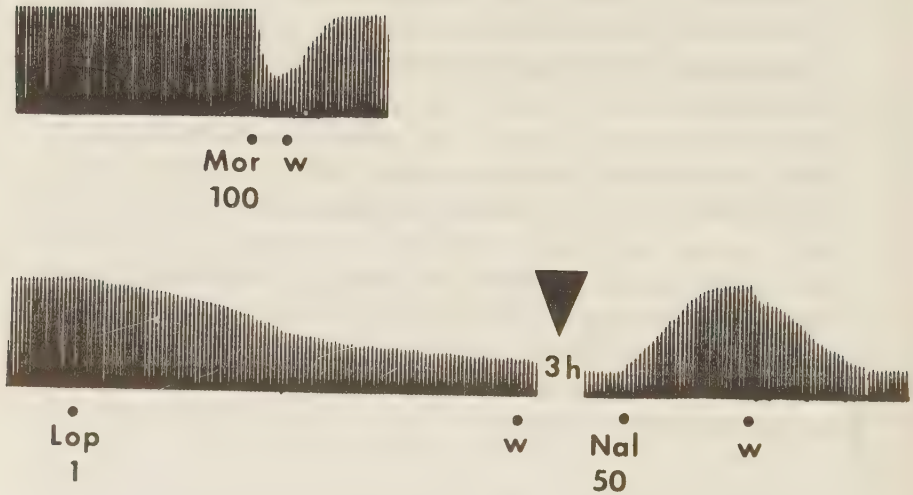


Abb. 6 Hemmung der elektrisch stimulierten Längsmuskelpreparation durch Morphin (Mor) und Loperamid (Lop). Die Zahlen in Klammern bezeichnen die Substanzkonzentrationen im Organbad in nM, w (= waschen) zeigt die Erneuerung der Badeflüssigkeit an. Im unteren Teil der Abbildung markiert der Pfeil eine Waschperiode von 3h in 10 min Intervallen; bei Nal wurde Naloxon zugegeben.

ihren maximalen Effekt erreicht haben (Abb. 6). Andererseits kann die Hemmung durch Erneuerung der Badeflüssigkeit, d.h. durch "Auswaschen" nicht beseitigt werden.

Während die Morphinwirkung schnell und vollständig durch Waschen der Präparation aufgehoben wird, wird die von Loperamid verursachte Hemmung auch durch mehrstündiges Waschen in 10-Minuten-Intervallen nicht verändert. Daß dieser langanhaltende Effekt nicht durch eine außergewöhnlich starke, evtl. kovalente Bindung am Rezeptor verursacht wird zeigt die Zugabe von Naloxon: die Wirkung wird aufgehoben. Anschließendes Waschen entfernt dann allerdings den Antagonisten und stellt die ursprüngliche Hemmung wieder her.

Es ist für die narkotischen Analgetika gezeigt worden, daß Wirkungseinsatz und Auswaschgeschwindigkeit von den lipophilen Eigenschaften der Substanzen abhängig sind (Kosterlitz und Waterfield, 1975), das extreme Verhalten der Antidiarrhoika muß allerdings durch zusätzliche Faktoren verursacht werden.

2.2.4. Korrelation mit der Rezeptoraffinität

Erste Arbeiten, die die Rangordnung der Rezeptoraffinitäten verschiedener Agonisten und Antagonisten mit deren pharmakologischer Aktivität an der Längsmuskelpräparation verglichen, ergaben eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen (Kosterlitz und Waterfield, 1975). In der Folge konnte sogar gezeigt werden, daß identische molare Konzentrationen einen halbmaximalen Effekt (IC_{50} bzw. ED_{50}) in beiden in vitro Tests verursachen (Creese und Snyder, 1975).

Im Gegensatz dazu zeigen die Antidiarrhoika nicht diese gute Übereinstimmung (Wüster und Herz, 1976; Mackerer et al., 1976). In Abbildung 7 sind die Rezeptoraffinitäten

der untersuchten Substanzen mit deren Aktivität an der Längsmuskelpräparation verglichen. Gleiche Wirkungsstärke in beiden Tests, durch die Gerade angedeutet, besitzen nur einige narkotische Analgetika. Alle Anti-diarrhoika weichen deutlich davon ab, d.h. ihre Aktivität am isolierten Organ ist bis zu 70 mal höher als die entsprechende Rezeptoraffinität.

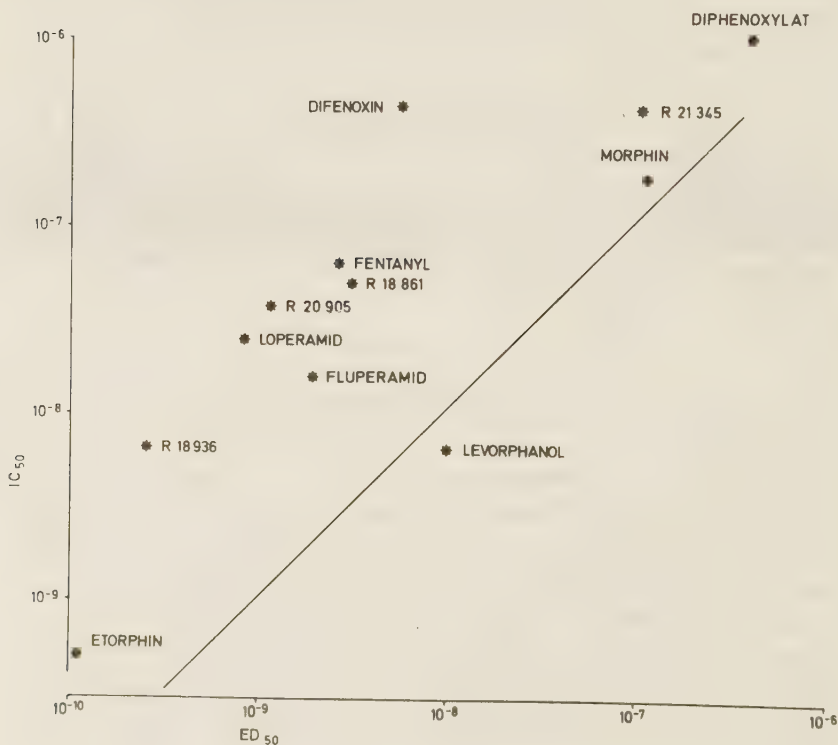


Abb. 7 Korrelation von Rezeptoraffinität (IC_{50} im Plexus Myentericus) und pharmakologischer Aktivität am isolierten Organ (ED_{50}). Eine identische Wirkungsstärke in beiden Tests ist durch die Gerade bezeichnet.

Im Hinblick auf die von ihnen beobachtete gute Korrelation der Ergebnisse entwickelten Cresse und Snyder (1975) ein Konzept, welches Annahmen für die Existenz von "intrinsic activity" oder "spare receptors" überflüssig machen. Demnach wird die Wirkung eines Opiates am Rezeptor allein durch seine Affinität bestimmt. Ähnliche Befunde wurden bereits erhoben für den muskarnisch-cholinergen Rezeptor (Yamamura und Snyder, 1974), den Insulinrezeptor (Cuatrecasas, 1971) oder für Tetradotoxin-Bindungsstellen (Colquhoun und Ritchie, 1972).

Die hier für die Antidiarrhoika ermittelte Dissoziation von Rezeptoraffinität und Effektivität an der Längsmuskelpräparation widerlegt nicht zwangsläufig dieses Konzept. Wie in 2.2.5. gezeigt, akkumulieren manche Opiate im Gewebe, besonders ausgeprägt die Substanzen mit Piperidinbutanamid-Struktur. Die starke Konzentration im isolierten Organ ist die wahrscheinliche Erklärung für die zu hohe pharmakologische Aktivität der Antidiarrhoika.

2.2.5. Akkumulation der Substanzen im Gewebe

Im Normalfall wird bei der Bestimmung von biologischen Aktivitäten an isolierten Organen die zu untersuchende Substanz in die das Gewebe umspülende Badeflüssigkeit gegeben. Dort verteilt sie sich gleichmäßig, u.a. durch die ständige Durchperlung des Puffers mit Carbogen. Es wird bei diesen Untersuchungen stets davon ausgegangen, daß die nominelle, im Bad vorhandene molare Konzentration auch der Konzentration des Pharmakons im Gewebe bzw. am Rezeptor entspricht. Im Hinblick auf die in

2.2.4. erhobenen Befunde, bei welchen sich eine unerwartet hohe Aktivität der Antidiarrhoika an der Längsmuskelpräparation ergab, konnte als eine der möglichen Ursachen eine Akkumulation der Substanzen im isolierten Organ angenommen werden.

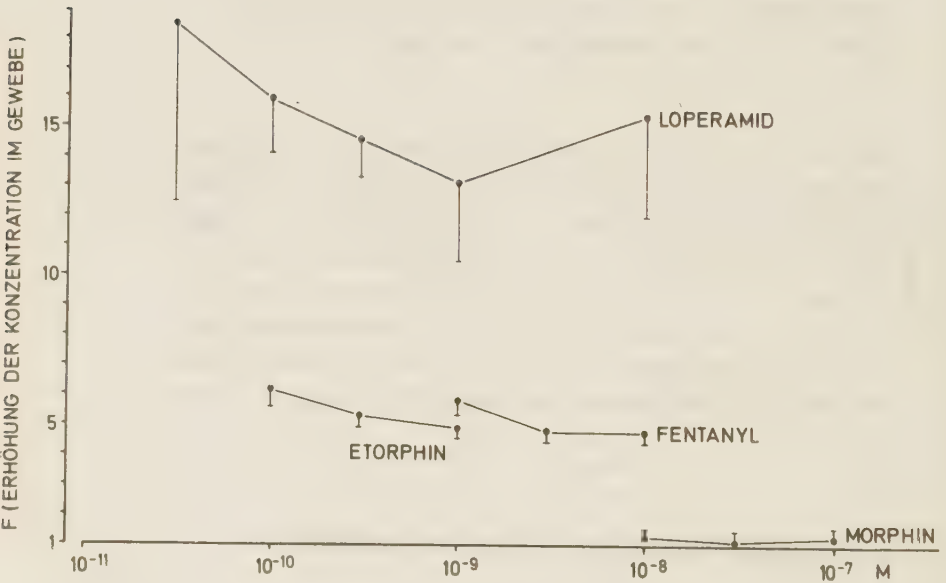


Abb. 8 Akkumulation von Opiaten im isolierten Organ. Ordinate: Erhöhung der Konzentration im Gewebe über die nominelle Konzentration im Organbad. Abszisse: Nominelle molare Konzentration im Organbad. Jeder Punkt stellt den Mittelwert aus 5-8 Bestimmungen dar.

Es wurden deshalb Dosenwirkungskurven für radioaktiv markierte Substanzen aufgestellt, bei denen außer der nominellen, errechneten Molarität auch die tatsächlichen Konzentrationen im Puffer und Gewebe bestimmt wurden. Nach Erreichen der maximalen pharmakologischen Wirkung wurde dazu die Radioaktivität in beiden Medien gemessen (siehe 4.2.4.) und, unter der Annahme identischer spezifischer Gewichte, das Verhältnis zwischen den tatsächlichen, molaren Konzentrationen in der Längsmuskelpräparation und im Puffer errechnet (Abb. 8). Der Faktor F repräsentiert dabei die Erhöhung der Konzentration im isolierten Organ über das Niveau der Badeflüssigkeit (= 1). Für ^3H -Morphin und ^3H -Methionin-Enkephalin (nicht gezeigt) ist F annähernd 1, d.h. die in beiden Medien gemessenen Konzentrationen sind nicht signifikant verschieden.

Die narkotischen Analgetika ^3H -Fentanyl und ^3H -Etorphin zeigen im Gewebe eine etwa 5fach erhöhte Konzentration, während die Akkumulation des Antidiarrhoikum ^3H -Loperamid am stärksten ausgeprägt ist (15fach). Die unterschiedliche Konzentration der Substanzen ist wahrscheinlich abhängig von den verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften der Opiate (Wüster und Herz, 1976), darauf wird in 2.6.2. nochmals eingegangen.

Es wird hier unterstellt, daß die Akkumulation, die im Gewebe meßbar ist, auch eine erhöhte Konzentration des Pharmakons am Rezeptor repräsentiert. Diese Annahme kann durch Versuche nicht auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden, ein indirekter Beweis stellt die in 2.2.5. beobachtete erhöhte Aktivität an der Längsmuskelpräparation dar.

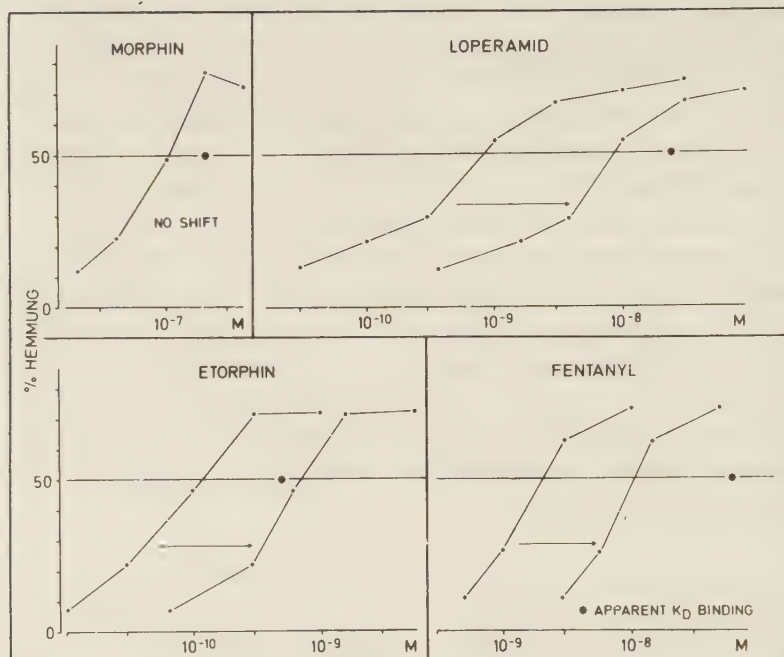


Abb. 9 Verschiebung der Dosenwirkungskurven. Statt der nominellen Konzentration im Organbad (jeweils die linke Kurve) werden die tatsächlich im Gewebe gemessenen molaren Konzentrationen (rechte Kurve) mit der Wirkung in Beziehung gesetzt. Die Rezeptoraffinität (IC_{50}) dieser Substanz ist jeweils durch * gekennzeichnet.

Für die einzelnen Substanzen wurden folgerichtig in den Dosenwirkungskurven die nominell dem Bad zugesetzten Konzentrationen durch die tatsächlich gemessenen ersetzt (Abb. 9). Außer für Morphin ergibt sich für alle Substanzen eine (unterschiedlich starke) Rechtsverschiebung. Das hat zur Folge, daß die ED_{50} eine ähnliche

Größenordnung wie die entsprechende Rezeptoraffinität annimmt. Das von Creese und Snyder (1975) für die nar- kotischen Analgetika aufgestellte Konzept über den Zu- sammenhang zwischen Affinität der Substanz zum Rezep- tor und ihrer Wirkungsstärke (2.2.5.) kann also für die Antidiarrhoika als gültig anerkannt werden; oder umge- kehrt ausgedrückt, es braucht keine besondere "intrin- sic activity" der Substanzen angenommen zu werden.

2.3. Antinozizeptive Effekte in Nagetieren

2.3.1. Vorbemerkungen

Die synthetischen Antidiarrhoika werden beschrieben als selektiv darmwirksame Pharmaka, mit denen sich antino- zizeptive Effekte nicht oder nur nach Applikation sub- toxischer Dosen erreichen lassen (Stockbroeckx et al., 1973; Van Bever et al., 1976). Eine der Analgesie ver- gleichbare zentrale Wirkung muß in den Versuchen von Colpaert (1975) angenommen werden, in denen oral verab- folgtes Diphenoxylat (im Gegensatz zu Loperamid) den "narcotic cue" auszulösen vermag.

Über zentrale Effekte am Menschen ist berichtet, daß Diphenoxylat in hohen Dosen morphinomimetrisch wirkt (Jaffe und Martin, 1975) sowie als Substitutionsmittel in der Therapie Morphinabhängiger erprobt wird (Goodman, 1968).

Alle z.Zt. vorliegenden Veröffentlichungen berichten je- doch ausschließlich über Effekte nach oraler Applikation. Wir untersuchten deshalb, ob durch Injektion (intravenös, intraventrikulär) eine ausgeprägtere zentrale Wirkung

erreichbar wäre. Die antinozizeptive Wirkung von Loperamid, Diphenoxylat, R 18 936 und Morphin bei Mäusen und Ratten wurde im Vokalisationstest (Carrol und Lim, 1960; Hoffmeister, 1968) bestimmt.

2.3.2. Wirkung nach intravenöser Injektion

Mit allen getesteten Substanzen konnten in Ratten und Mäusen nach intravenöser Injektion antinozizeptive Effekte erreicht werden.

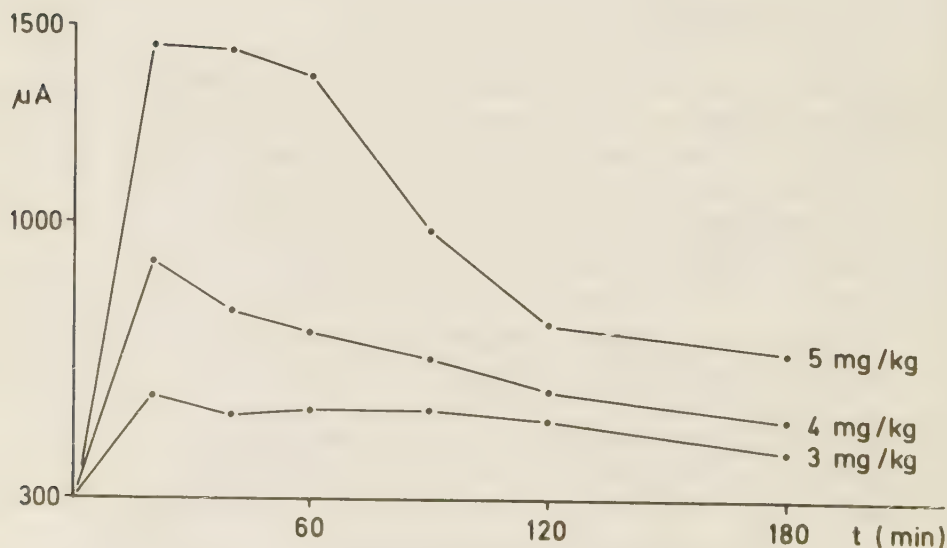


Abb. 10 Zeitlicher Verlauf der antinozizeptiven Wirkung von Loperamid an der Ratte nach intravenöser Injektion.
Ordinate: Erhöhung der Reizschwelle in μA ;
Abszisse: Zeit nach Injektion. $n = 10$.

Abbildung 10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Reizschwellenerhöhung durch Loperamid bei Ratten. Die antinozizeptive Wirkung ist dosisabhängig, die ED_{50} beträgt 3,75 mg/kg, gegenüber einer LD_{50} von ca. 5 mg/kg.

Tabelle 4

Antinozizeptive Aktivitäten bei Nagetieren nach intravenöser Injektion (mg/kg)

	Maus		Ratte	
	ED_{50}	LD_{50}^{**}	ED_{50}	LD_{50}^{**}
Loperamid	1.9	10.0	3.7	5.0
R 18 936	0.2	2.5	0.75	2.0
Diphenoxylat	2.3	7.0	-	-
Morphin	2.5	200.0	3.5	150.0
n = 10				
** Die LD_{50} -Werte wurden nur näherungsweise bestimmt.				

Die mittleren wirksamen Dosen aller Substanzen im Vergleich zu den entsprechenden LD_{50} sind in Tabelle 4 dargestellt, insgesamt lassen sich mit den Antidiarrhika analgetische Effekte nur sehr schwer, d.h. bei Applikation von subtoxischen Dosen erreichen. Dabei ist die "therapeutische Breite" bei Mäusen geringfügig besser als bei Ratten.

Bei Injektion analgetisch wirkender Dosen bei Mäusen

verursachten alle Substanzen weitere morphinomimetische Erscheinungen wie Straub'sches Schwanzphänomen oder motorische Erregungszustände. Das Auftreten dieser Symptome wurde jedoch zeitweilig von atypischen Effekten (starke Sedation) überlagert. Antinozizeptiv- und andere opiatähnliche Effekte wurden durch die Injektion von Naloxon (1 mg/kg i.p.) vollständig aufgehoben.

2.3.3. Wirkung nach intraventrikulärer Injektion

Aus der starken antinozizeptiven Wirkung der Opiate nach intraventrikulärer Injektion (Adler, 1964) kann geschlossen werden, daß die dafür verantwortlichen Gehirnstrukturen leicht vom Ventrikelsystem aus erreichbar sind; als Angriffspunkt werden hauptsächlich Gebiete im Boden des 4. Ventrikels angenommen (Herz et al., 1970). Nachdem auch im Radiorezeptorassay die hohe Rezeptorendichte in diesen Gebieten (Kuhar et al., 1973) und die gute Korrelation zwischen Rezeptoraffinitäten von Opiaten und ihrer Wirksamkeit nach intraventrikulärer Injektion gezeigt wurden (Terenius, 1974), war es von Interesse, die morphinartige antinozizeptive Wirkung der Antidiarrhoika nach Applikation in die unmittelbare Umgebung des Rezeptors zu untersuchen. Nach Injektion in den Seitenventrikel verursachte keine der Substanzen über den gesamten getesteten Bereich, einschließlich toxischer Dosen, eine meßbare Erhöhung der Reizschwelle (Tab. 5). Versuche, bei denen die Substanzen in den 4. Ventrikel gegeben wurden, verliefen identisch.

Tabelle 5

Intraventrikuläre Injektion bei Ratten

a) Antidiarrhoika; applizierte Dosen ($\mu\text{g}/\text{Tier}$)

Loperamid	0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0
R 18936	0.3, 1.0, 3.0, 10.0, 40.0
Diphenoxylat	10.0, 20.0, 40.0, 80.0

Die höchste angegebene Dosis entspricht jeweils der LD_{100}

b) Narkotische Analgetika; ED_{50} ($\mu\text{g}/\text{Tier}$)

Morphin	7.5
Etorphin	0.09
Fentanyl	2.5

n = 5

Zur Klärung dieser unerwarteten Befunde wurden autoradiographische Studien mit ^3H -Loperamid durchgeführt, die über die Ausbreitung der Substanz im Rattengehirn nach intraventrikulärer Injektion Aufschluß geben sollten. Diese Studien ergaben, daß ^3H -Loperamid, im Gegensatz zu dem parallel untersuchten narkotischen Analgetikum ^3H -Etorphin, nur in nicht meßbarem Maße durch die das Ventrikelsystem begrenzenden Membranen in das umliegende Gewebe penetriert. Anders als bei ^3H -Etorphin verteilt sich die Substanz fast ausschließlich im Ventrikelsystem, ohne daß die Rezeptoren in den periventrikulären Strukturen erreicht werden.

2.4. Pharmakokinetik

2.4.1. Einfluß auf die Wirkung von Opiaten

Bei der systemischen Applikation von Pharmaka wird die Wirkungsstärke entscheidend von der Verfügbarkeit am Rezeptor, u.a. Resorption und Verteilung im Körper, bestimmt. Die narkotischen Analgetika, deren chemische Struktur nicht einer einheitlichen Klasse zuzuordnen ist, unterscheiden sich stark in ihrer Pharmakokinetik. So ist für Morphin bekannt, daß es nur sehr schwer in das ZNS eindringt (Way und Adler, 1960), während z.B. beim Fentanyl die starke Wirksamkeit zum Teil auf die höhere Konzentration zurückzuführen ist, die die Substanz im Gehirn erreicht. Diese Unterschiede in der Kinetik sind ein Ausdruck der verschiedenen physikochemischen Eigenschaften der Opiate (siehe 2.5.), so ist allgemein anerkannt, daß lipophile narkotische Analgetika die Blut-Gehirn-Schranke besser penetrieren als hydrophile (von Cube et al., 1970; Herz und Teschemacher, 1971).

2.4.2. Befunde aus anderen Untersuchungen

Die Pharmakokinetik oral applizierter Antidiarrhoika wurde mittels radioaktiv markierter Substanzen an Ratten untersucht (Heykants et al., 1972; Heykants et al., 1974). Diphenoxylat, Difenoxin und Loperamid haben eine ähnliche, charakteristische Verteilung. So werden außerhalb des Gastrointestinal-Traktes nur sehr geringe Radioaktivitäten gemessen, der größte Teil davon an Metaboliten der Ausgangssubstanzen gebunden. Etwa 30% der applizierten Radioaktivität wird in die Galle

ausgeschieden und von dort wieder dem Darm zugeführt, ein Befund, der im Sinne eines ausgeprägten enterohepatischen Kreislaufs interpretiert wird. Die Substanzen werden zu über 90% mit dem Faeces ausgeschieden, Diphenoxyolat als Difenoxin, Loperamid in der Form des Mono- und Bidesmethylderivates (Karim und Heykants, 1976).

2.4.3. Pharmakokinetik von Loperamid - Morphin

Die Pharmakokinetik von ³H-Loperamid in Mäusen wurde nach intravenöser Injektion einer analgetisch wirksamen Dosis (5 mg/kg) ermittelt. Es wurde sowohl die Verteilung der Gesamtradioaktivität wie die des unveränderten Loperamids untersucht.

Die Verteilung der Gesamtradioaktivität in verschiedenen Organen, Geweben und Blut bis zu 12 Stunden nach Applikation zeigt Abbildung 11. Die verschiedenen Gewebe lassen sich in 2 Gruppen aufteilen, zu der ersten gehören: Lunge, Leber, Niere, Skelettmuskel. Hier ist die Konzentration unmittelbar nach der Injektion am höchsten und fällt dann steil ab. Zu der zweiten Gruppe gehören Blut, Gehirn, Dünndarm. Der Gehalt an Radioaktivität ist niedrig, bleibt aber gleich oder steigt mit zunehmender Zeit nach der Injektion sogar an.

Von allen untersuchten Organen ist die Konzentration in der Lunge am höchsten, ein Befund, der auch für andere, lipophile opiatartige Substanzen erhoben wurde (Hess et al., 1971). Die Lunge enthält pro Gewichtseinheit bis zu 20 mal mehr Loperamid als das Blut. Auffallend niedrig sind die Konzentrationen im Gehirn, sie liegen erheblich

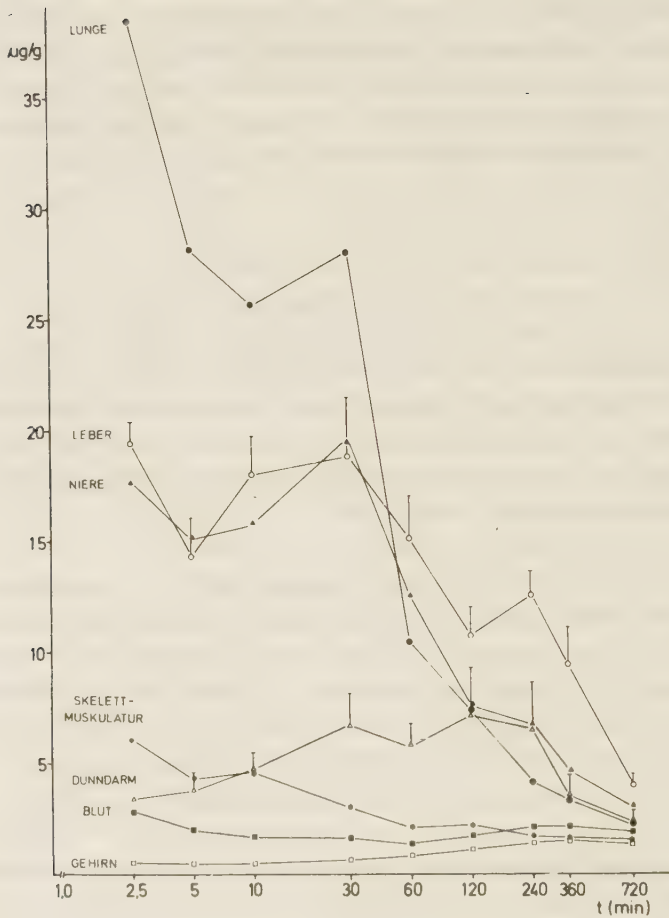


Abb. 11 Zeitverlauf der Gesamtradioaktivität in verschiedenen Geweben nach Injektion von ^3H -Loperamid (5 mg/kg, i.v.) bei der Maus. Jedes Symbol stellt den Mittelwert aus 6 Experimenten dar. Um die Darstellung übersichtlich zu halten, sind die Standardabweichungen nur bei 2 Kurven eingezeichnet; diese sind auch für die anderen Kurven repräsentativ. Ordinate: μg pro g Feuchtgewebe, berechnet auf ^3H -Loperamid; Abszisse: Zeit nach Injektion.

Tabelle 6

Vergleich der Gesamtradioaktivitäten in verschiedenen Geweben der Maus nach Injektion von ^3H -Loperamid (L) bzw. ^3H -Morphin (M), 5 mg/kg, i.v. Die Konzentrationen ($\mu\text{g pro g}$ Feuchtgewebe) sind auf die Ausgangssubstanzen bezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils 6 Experimenten.

Gewebe		5	10	30	60	120 min
Blut	L	2.01	1.69	1.65	1.37	1.71
		± 0.37	± 0.11	± 0.14	± 0.20	± 0.30
	M	5.79	4.22	2.62	1.00	0.57
		± 1.07	± 0.57	± 1.40	± 0.10	± 0.10
Gehirn	L	0.50	0.49	0.64	0.81	1.12
		± 0.12	± 0.09	± 0.09	± 0.14	± 0.26
	M	0.53	0.55	0.45	0.36	0.36
		± 0.12	± 0.04	± 0.08	± 0.02	± 0.03
Lunge	L	28.1	25.6	28.0	10.4	7.3
		± 10.5	± 6.1	± 7.5	± 1.6	± 1.1
	M	6.0	3.9	1.6	2.0	0.8
		± 0.4	± 0.1	± 0.1	± 0.1	± 0.3
Leber	L	14.2	18.1	18.8	15.1	10.7
		± 1.7	± 1.8	± 2.8	± 1.9	± 1.3
	M	10.6	7.3	3.4	2.3	1.3
		± 0.4	± 1.6	± 0.7	± 0.3	± 0.5
Skelett- muskel	L	4.3	4.6	3.0	2.1	2.2
		± 1.0	± 0.4	± 0.4	± 0.4	± 0.5
	M	3.9	2.3	1.7	2.9	2.2
		± 0.8	± 0.3	± 0.4	± 0.3	± 0.2
Dünndarm	L	3.7	4.7	6.7	5.7	7.1
		± 0.5	± 0.7	± 1.5	± 1.0	± 1.5
	M	3.6	3.6	1.7	0.9	1.0
		± 0.6	± 0.2	± 0.2	± 0.4	± 0.4

(3-4 mal) unter den Blutwerten. Die Radioaktivität in der Wand des Dünndarms zeigt einen Zeitverlauf, der sich deutlich von dem in anderen untersuchten Geweben unterscheidet. Während nach 2,5 Minuten die Konzentration ähnlich niedrig wie im Blut ist, steigt sie bis zu 240 Minuten nach Injektion stark an, danach fällt sie ab, ähnlich wie in Lunge, Leber oder Niere gemessen. In Abbildung 11 nicht enthalten sind die Werte für die ebenfalls untersuchte Magenwand; der Kurvenverlauf für dieses Organ weicht nicht signifikant von dem des Dünndarms ab, wenn auch die Konzentrationen allgemein etwas niedriger liegen.

Einige für ^3H -Loperamid gemessene Radioaktivitäten sind in Tabelle 6 denen für ^3H -Morphin gegenübergestellt. Die Verteilung der beiden Substanzen im Körper unterscheidet sich grundsätzlich. Morphin erreicht die höchsten Konzentrationen in allen Organen zwischen 5 und 10 Minuten nach Injektion und fällt danach steil ab. Es finden sich weder die für Loperamid festgestellten hohen Werte in der Lunge, noch die langsam einsetzende Akkumulation der Substanz in der Wand des Magen-Darm-Traktes.

2.4.4. Metabolisierung

Bestimmt man die Mengen von unverändertem ^3H -Loperamid im Blut (Abb. 12), dann ergibt sich, daß bereits 5 Minuten nach Injektion nur noch 35% der gesamten Radioaktivität an nicht metabolisierte Substanz gebunden sind, der Wert fällt nach 60 Minuten auf unter 20% ab. Obwohl die Substanzkonzentrationen im Gehirn (Abb. 13) generell etwa viermal niedriger als im Blut sind, bleibt

das Verhältnis zwischen unverändertem und metabolisiertem Loperamid entsprechend. Es ist hier außerdem ersichtlich, daß die Menge des unveränderten Loperamids im Gehirn stetig abnimmt; der in Abbildung 11 gezeigte Anstieg

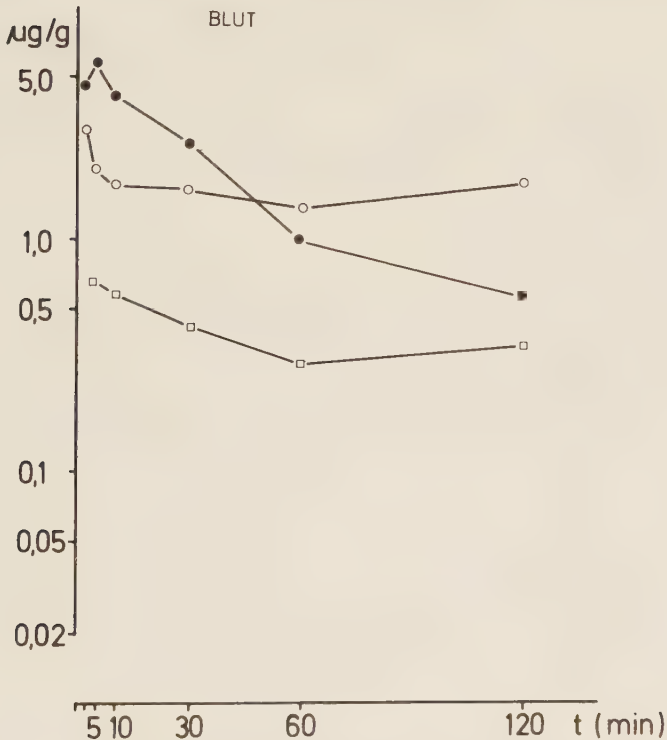


Abb. 12 Zeitverlauf der Radioaktivität im Blut nach Injektion markierter Substanzen (5 mg/kg, i.v.) bei Mäusen. o—o Loperamid-Gesamtradioaktivität; □—□ unverändertes Loperamid; ●—● Morphin-Gesamtradioaktivität. Angaben in µg pro g Feuchtgewebe, bezogen auf die jeweilige Ausgangssubstanz.

der Radioaktivität ist auf die Bildung von Metaboliten zurückzuführen, die dünnschichtchromatographisch als lipophile Derivate der Ausgangssubstanz charakterisiert wurden. Im Gegensatz dazu ist der Anstieg der Gesamtradioaktivität in der Wand des Dünndarms nicht ausschließlich auf die Akkumulation von Metaboliten zurückzuführen

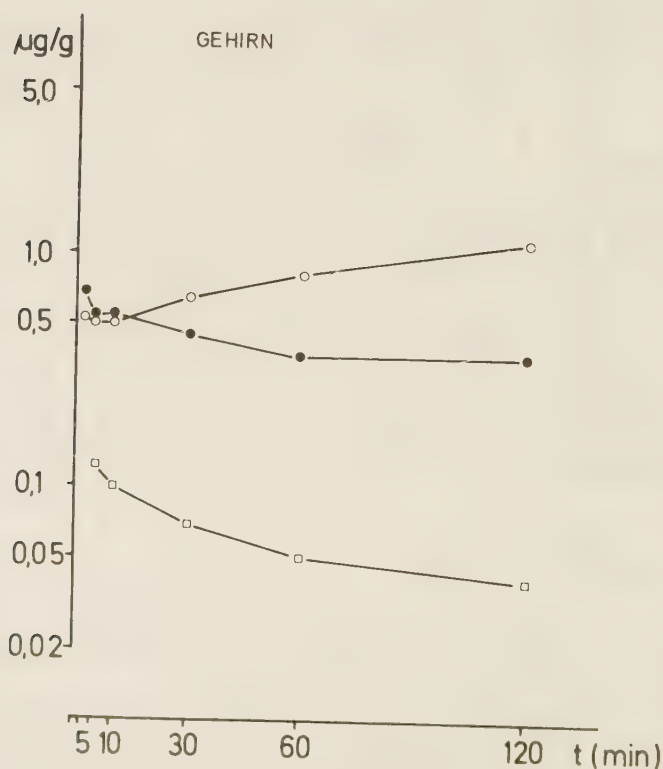


Abb. 13 Zeitverlauf der Substanzkonzentrationen im Gehirn. Erklärung siehe Abb. 12.

(Abb. 14); die absolute Menge an unveränderter Substanz im Darm steigt auch bei parenteraler Applikation und trotz schneller Metabolisierung im Blut bis 30 Minuten nach Injektion leicht an. Außerdem ist der Anteil an nicht metabolisierter Substanz in diesem Gewebe größer als im Blut oder Gehirn, er beträgt bis zu 50%.

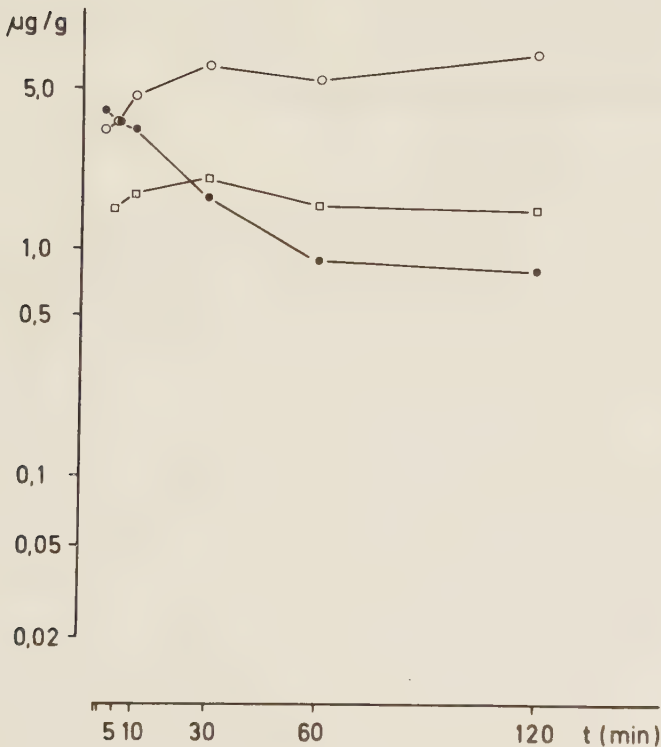


Abb. 14 Zeitverlauf der Substanzkonzentrationen in der Wand des Dünndarms. Erklärung siehe Abb. 12.

Für die beiden Hauptmetaboliten des Loperamids, R 21 345 und R 20 905 sind relativ hohe Rezeptoraffinitäten gefunden worden (Tab. 2). Von den hier im Blut, Gehirn und Darmwand gemessenen Metaboliten ist die Struktur nicht bekannt, bei den relativ hohen Konzentrationen kann aber ein Beitrag zur pharmakologischen Wirkung nicht ausgeschlossen werden. Eine genaue Untersuchung dieser Frage lag jedoch nicht im Rahmen der Problemstellung.

2.5. Physiko-chemische Eigenschaften

2.5.1. Vorbemerkungen

Die in 2.4. beschriebene, atypische Pharmakokinetik von ³H-Loperamid wirft die Frage auf nach dem Mechanismus für die enterale Akkumulation (und damit wahrscheinlich auch für die selektive Wirksamkeit am Darm) dieser und ähnlicher Substanzen. Es lag nahe, die Ursache in den physiko-chemischen Eigenschaften der Substanzen zu suchen. Daher mußten die verschiedenen Parameter bestimmt und mit denen der "normalen" narkotischen Analgetika verglichen werden. Dabei konnte auf eine Reihe von Arbeiten zurückgegriffen werden, in denen Verteilungskoeffizienten (Herz und Teschemacher, 1971), Plasma-proteinbindungen (Hölldt und Teschemacher, 1975) oder pK-Werte (Beckett, 1956) von Opiaten untersucht wurden.

Eng verknüpft mit der Pharmakaresorption oder Verteilung ist im allgemeinen die Löslichkeit einer Substanz. Der Transport von Materialien über biologische Membranen wird normalerweise durch einfache Diffusion oder durch Penetration durch Poren bewerkstelligt (Brodie, 1964),

in beiden Fällen ist eine gute Löslichkeit in entweder polaren oder unpolaren Medien Voraussetzung. Tabelle 7 zeigt die Löslichkeit von Loperamid in verschiedenen Lösungsmitteln.

Tabelle 7

Löslichkeiten von Loperamid*

Lösungsmittel	g Loperamid pro 100 ml Lösungsmittel
Aqua dest pH 4.5	0.21
0.01 M HCl	0.065
0.01 M NaOH	0.082
Hexan	0.22
Chloroform	39.71
Methanol	31.23
Propylenglykol	5.64
Äther	0.075
Aceton	0.38
Dimethylsulfoxid	17.96
*Die Daten wurden dem "Specification Report 524 (710121), Janssen Pharmaceutica" entnommen.	

Loperamid ist schlecht löslich in allen wässrigen und vielen organischen Medien, gut löslich u.a. in Chloroform, Methanol oder Dimethylsulfoxid.

Die geringe Löslichkeit in den meisten Flüssigkeiten stellt eine entscheidende Schwierigkeit bei der Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften dar.

Während bei allen anderen in vivo und in vitro Experimenten die Lösungen durch Zugabe eines inerten Lösungsvermittlers (Propylenglykol) bereitet werden konnten (siehe 4.1.), mußte hier wegen der möglichen Beeinflussung der Ergebnisse auf dieses Hilfsmittel verzichtet werden. In den Fällen, in welchen die erforderlichen Substanzkonzentrationen ohne fremde Zusätze nicht erreicht werden konnten (z.B. bei den photometrischen Bestimmungen), wurde auf die Untersuchung verzichtet.

2.5.2. Verteilungskoeffizient

Die Verteilungskoeffizienten in Heptan/Phosphatpuffer sind in Tabelle 8 wiedergegeben. Von Morphin als einer stark hydrophilen Substanz bis zum lipophilen Methadon erstrecken sich die Werte über einen Bereich von 6 Zehnerpotenzen. Das Ergebnis für ^3H -Loperamid, das einzige Antidiarrhoikum, für das die Verteilung in den beiden Phasen mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt werden konnte, liegt im Bereich von Etorphin, einem mäßig lipophilen, stark wirksamen narkotischen Analgetikum. Alle Antidiarrhoika konnten jedoch auf ihr Verhalten in der Dünnschichtchromatographie untersucht werden. In Anlehnung an von Cube et al. (1969) wurden die Laufhöhen in dem dort angegebenen Fließmittelsystem bestimmt (Äthylacetat/Isoamylalkohol/Isopropanol/25%iger Ammoniak/Aqua dest.; 6:8:6:3:1). Der R_f -Wert aller Antidiarrhoika ist in diesem System identisch ($R_f = 0.56$), gegenüber dem bei von Cube angegebenen Wert für Etorphin $R_f = 0.82$.

Da Pharmaka in ionisierter Form allgemein nur wenig lipoidlöslich sind, könnten hohe Dissoziationskonstanten der Antidiarrhoika eine schlechte Resorption aus dem Magen-Darm-Trakt bewirken, wie es z.B. bei den quartären Ammoniumverbindungen der Fall ist.

Die pK-Werte der Antidiarrhoika und narkotischen Analgetika liegen bei den hier getesteten Substanzen zwischen 8.0 und 9.3, sie bieten demnach keine Erklärung für die besondere Darmwirksamkeit einiger dieser Substanzen.

Tabelle 8

Physiko-chemische Eigenschaften

	Verteilungs- koeffizient Heptan/Phos- phatpuffer (pH 7.4)	pK	Plasma- protein- bindung
Morphin	0.00001	8.0	25 %
Levorphanol	0.01	9.3	-
Etorphin	1.4	8.0	73,5%
Loperamid	2.4	8.8	78 %
Fentanyl	19.3	8.4	69,5%
Methadon	44.9	9.2	-

2.5.3. Plasmaproteinbindung

Die Bindung von Pharmaka an Proteine des Blutes oder Gewebes ist von grundlegender Bedeutung im Hinblick

auf die Wirkung. So muß man annehmen, daß nur die nicht gebundenen Anteile der Pharmakamoleküle aus der Blutbahn in das Gewebe übertreten (Goldstein, 1949). Die hohe Plasmaproteinbindung eines Opiates würde demnach dessen Permeation durch die Blut-Gehirn-Schranke erschweren.

Die Proteinbindung der verschiedenen, radioaktiv markierten Substanzen wurde mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt (Scholtan, 1962). Der für ^3H -Loperamid bestimmte Wert ist sehr hoch, aber vergleichbar mit dem für ^3H -Etorphin (Tab. 8). Auch für andere lipophile narkotische Analgetika ist eine ähnlich starke Bindung an Plasmaproteine gezeigt worden, z.B. für Fentanyl 69,5% (Höllt und Teschemacher, 1975).

2.5.4. Grenzflächenaktivität

Substanzen, die in ihrer molekularen Struktur sowohl hydrophile als auch lipophile Gruppen in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander besitzen, haben die Fähigkeit, die Eigenschaften von Grenzflächen zu verändern. Sie werden als Tenside oder Detergentien bezeichnet. Indem sie sich an Grenzflächen ansammeln und entsprechend ihrer Ladung ausrichten, verringern sie die Oberflächenspannung zwischen zwei Medien (flüssig-flüssig, flüssig-fest, flüssig-gasförmig). Die biologische Aktivität der Tenside beruht darauf, daß sie die Permeabilität der Zellmembranen beeinflussen, entweder durch Herauslösen von Proteinbestandteilen aus den Membranen oder durch einfaches Einhüllen der Oberflächen.

Die Substanzen lassen sich nach der unterschiedlichen Ladung der hydrophilen Gruppe in 4 Klassen unterteilen:

1. nicht ionogene (Polysorbate, Tweens)
2. kationenaktive (quartäre Ammoniumverbindungen)
3. anionenaktive (Seifen, Alkylsulfate und -sulfonate)
4. ampholytische
Tenside (als hydrophile Gruppen sind sowohl kationische wie anionische Zentren vorhanden).

Tenside werden normalerweise benutzt zur Haut- und Gerätedesinfektion (kationenaktive T.) oder als Lösungsvermittler für wasserunlösliche Pharmaka (nicht ionische T.).

Alle Grenzflächenaktivitäten wurden in einem Tensiometer nach La Comte de Noüy gemessen; für Opiate, Antidiarrhoika sowie typische Detergentien wurde deren Einfluß auf die Oberflächenspannung von Krebs-Ringer-Tris-Puffer (72 dyn/cm) bestimmt (Abb. 15). Obwohl der Effekt der Antidiarrhoika weniger ausgeprägt ist als der von typischen Detergentien, wie z.B. Benzalkoniumchlorid oder Natriumlaurylsulfat, sind sie auch bei der relativ kleinen Konzentration $10^{-5}M$ meßbar aktiv. Die Wirkung ist dosisabhängig, auch bei der höchsten getesteten Konzentration wird für keine der Substanzen die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) erreicht.

Von allen getesteten narkotischen Analgetika besitzt nur Fentanyl Grenzflächenaktivität, seine Wirkungsstärke ist vergleichbar mit der der Antidiarrhoika. Andere Opiate (u.a. Morphin, Levorphanol, Etorphin, Naloxon) zeigen keinen Effekt bis $10^{-2}M$.

Die Grenzflächenaktivität ist demnach die einzige physiko-chemische Eigenschaft, durch die sich die Antidiarrhoika von den narkotischen Analgetika (mit Ausnahme von Fentanyl) grundsätzlich unterscheiden.

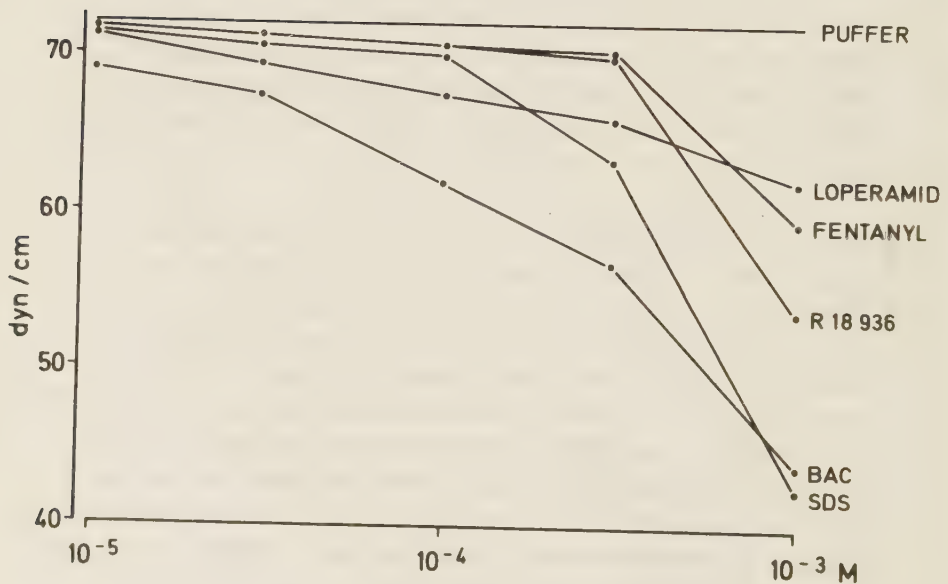


Abb. 15 Grenzflächenaktivität verschiedener Opiate und Detergentien.
Ordinate: Verminderung der Oberflächenspannung von Krebs-Ringer-Tris Puffer (71.6 dyn/cm); Abszisse: Molare Konzentration. Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

2.6. Unspezifische Bindung von ^3H -Loperamid an Gewebehomogenat

2.6.1. Rezeptorbindungsstudien mit ^3H -Loperamid

In 2.1. wird gezeigt, daß Loperamid eine hohe Affinität zum Opiatrezeptor besitzt, indem es die stereospezifische Bindung von ^3H -Naloxon hemmt. Eine direkte Besetzung dieser und evtl. anderer Rezeptorpopulationen durch Loperamid kann jedoch in diesen Studien nicht demonstriert werden. Dies ist nur möglich bei Anwendung der von Goldstein et al. (1971) beschriebenen Versuchsanordnung, in der die unterschiedliche Bindung einer radioaktiv markierten Substanz in Gegenwart entweder eines aktiven oder inaktiven Stereoisomers gemessen wird.

Es wurde versucht, den stereospezifisch gebundenen Anteil von hochmarkierten Loperamid sichtbar zu machen. Die benutzte Methode der schnellen Glasfaserfiltration entspricht der in 2.1. beschriebenen; die Versuchsanordnung wurde jedoch verändert, indem feste Mengen des unmarkierten Inhibitors mit steigenden Konzentrationen ^3H -Loperamid konkurrieren. Alle Versuche wurden parallel in Rattengehirn- und Längsmuskelhomogenat des Meerschweinchenileums durchgeführt, mit vergleichbaren Ergebnissen in beiden Medien.

Die Bindung von ^3H -Loperamid ist in Abbildung 16 gezeigt; unerwarteterweise sind die beiden Kurven identisch, gleichgültig, ob Dextrorphan oder Levorphanol (10^{-5}M) dem Inkubationsansatz zugesetzt wird. Auch durch die Abwesenheit jeglichen Inhibitors oder

Anwesenheit von anderen Opiaten wie Morphin, Etorphin, Fentanyl oder Naloxon (jeweils $10^{-5}M$) wird die Menge an gebundenem 3H -Loperamid nicht verändert.

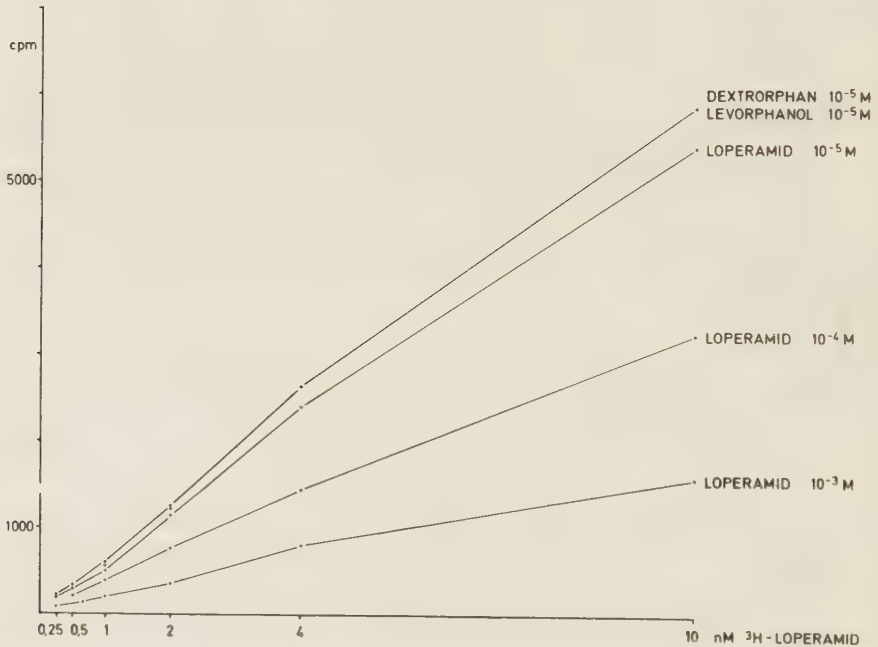


Abb. 16 Bindung steigender Konzentrationen von 3H -Loperamid an Rattengehirnhomogenat und deren Hemmung durch Loperamid. Ordinate: gebundenes 3H -Loperamid (cpm); Abszisse: 3H -Loperamidkonzentration. Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Die Bindung wird jedoch dosisabhängig erniedrigt durch sehr hohe Konzentrationen unmarkierten Loperamids (10^{-5} - 10^{-3} M) und vergleichbar auch durch das Loperamid-Derivat R 18 936 (nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse erwecken den Anschein, als würde sich Loperamid in der Art der Bindung von anderen Opiaten unterscheiden: es läßt sich durch die Versuche mit Dextrorphan-Levorphanol keine stereospezifische Bindung zum Opiatrezeptor demonstrieren. Es muß jedoch eher angenommen werden, daß sich die Substanz auf der molekularen Ebene ebenso verhält wie andere Opiate, d.h. durch das aktive Enantiomer vom Rezeptor verdrängt wird (Abb. 17). Wenn allerdings diese Verdrängung im Falle des ^3H -Loperamids nicht sichtbar wird, handelt es sich um eine methodische Schwäche der Bindungsstudien. Es genügt hier nicht, eine Substanz durch eine andere in seiner spezifischen Bindung zu ersetzen; um den Mechanismus sichtbar zu machen, muß die markierte Substanz auch aus dem Gewebe entfernt werden. Hierin unterscheidet sich ^3H -Loperamid von anderen Opiaten. Eine starke unspezifische Bindung bewirkt, daß ein vom Rezeptor verdrängtes Molekül im Gewebe festgehalten wird, die Gesamtmenge der meßbaren Radioaktivität wird nicht verändert. Erst durch hohe Loperamidkonzentrationen wird die markierte Substanz von der zweiten, unspezifischen Bindungsstelle - und damit aus dem Homogenat - entfernt.

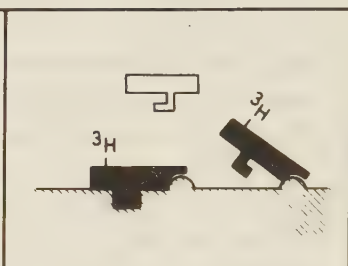
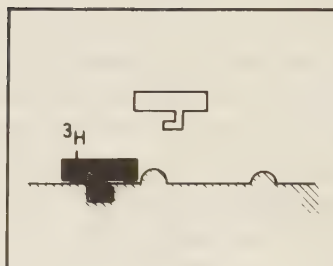
^3H -ETORPHIN



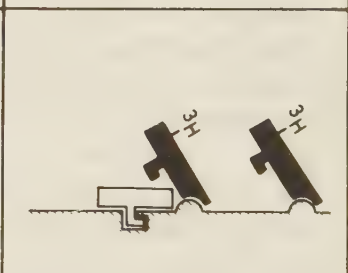
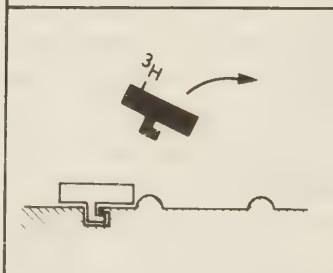
^3H -LOPERAMID



DEXTRORPHAN



LEVORPHANOL



LOPERAMID

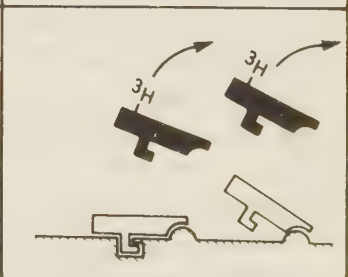
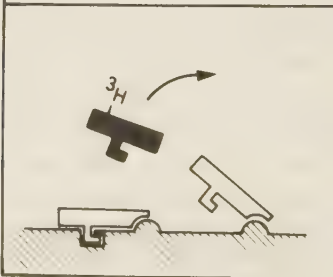


Abb. 17 Legende siehe Seite 59.

2.6.2. Vergleich der unspezifischen Bindung von Etorphin - Fentanyl - Loperamid

Es muß angenommen werden, daß die starke unspezifische Bindung von Loperamid am Gewebe auf der speziellen physiko-chemischen Eigenschaft des Moleküls beruht, die sich in 2.5.5. als Grenzflächenaktivität darstellt. Es wurden daher vergleichende Studien mit ^3H -Etorphin und ^3H -Loperamid durchgeführt, um die verschiedenartige unspezifische Bindung der beiden Opiate zu charakterisieren. Nachdem auch für das narkotische Analgetikum Fentanyl Grenzflächenaktivität meßbar war, wurde ^3H -Fentanyl in die Untersuchung mit einbezogen, um mögliche Unterschiede zum ^3H -Loperamid aufzuzeigen.

.

Abb. 17 Unterschiede in der unspezifischen Bindung von ^3H -Etorphin (links) und ^3H -Loperamid (rechts) im Gewebe. Die stereospezifische Rezeptorbindung ist durch eine L-förmige Vertiefung der Membran, die zweite Bindungsstelle des Loperamids durch eine halbrunde Erhöhung angedeutet. Radioaktiv markierte Substanzen sind mit ausgefüllten Symbolen dargestellt, ein Überschuß an nicht-markierter Substanz durch offene Symbole.

Obere Reihe: Das inaktive Isomer Dextrophan ist ohne Einfluß auf die Bindung beider Substanzen.

Mittlere Reihe: Levorphanol verdrängt beide Opiate aus der Rezeptorbindung, durch die unspezifische Bindungsstelle wird ^3H -Loperamid jedoch im Gewebe zurückgehalten.

Untere Reihe: Erst durch Loperamid wird ^3H -Loperamid aus beiden Bindungen verdrängt.

Die Versuche wurden bei gleichbleibenden Konzentrationen des jeweiligen Tracers (^3H -Etorphin: 10^{-9}M ; ^3H -Fentanyl: 10^{-8}M ; ^3H -Loperamid: 10^{-8}M) mit steigenden Mengen des unmarkierten Inhibitors durchgeführt. Als 100% Bindung wird die gemessene Radioaktivität in Abwesenheit jedes Inhibitors bezeichnet. In Abbildung 18 A demonstriert der Unterschied zwischen der Dextrorphan- und Levorphanolsäule den verdrängbaren, stereospezifisch gebundenen Anteil. Ähnliche Ergebnisse wie mit Levorphanol erhält man mit allen anderen Opiaten, einschließlich Loperamid und Fentanyl. In Abbildung 18 B, mit ^3H -Fentanyl als Tracer-substanz, ist die Verdrängung aus der stereospezifischen Bindung erheblich kleiner, aber noch meßbar. Durch hohe Dosen Fentanyl wird die gebundene Radioaktivität stärker reduziert als durch andere Opiate, ein Hinweis auf eine sättigbare Bindungsstelle des Fentanyls außerhalb der Opiatrezeptorbindung.

Für ^3H -Loperamid ist in Abbildung 18 C, wie schon in Abbildung 16, keine stereospezifische Bindung mehr demonstrierbar. Allerdings kann das gebundene ^3H -Loperamid durch hohe Konzentrationen unmarkiertes Loperamid (10^{-5} bis 10^{-3}M) aus einer unspezifischen, sättigbaren Bindung verdrängt werden. Es fällt auf, daß mit entsprechenden Mengen anderer Opiate dieser Effekt nicht erreicht werden kann. Auch Fentanyl, eine Substanz mit vergleichbar starker Grenzflächenaktivität, konkurriert nicht um die Loperamidbindungsstelle im Gewebe.

Als grenzflächenaktive, aber nicht opiataartig wirkende Pharmaka wurden die Neuroleptika Haloperidol und

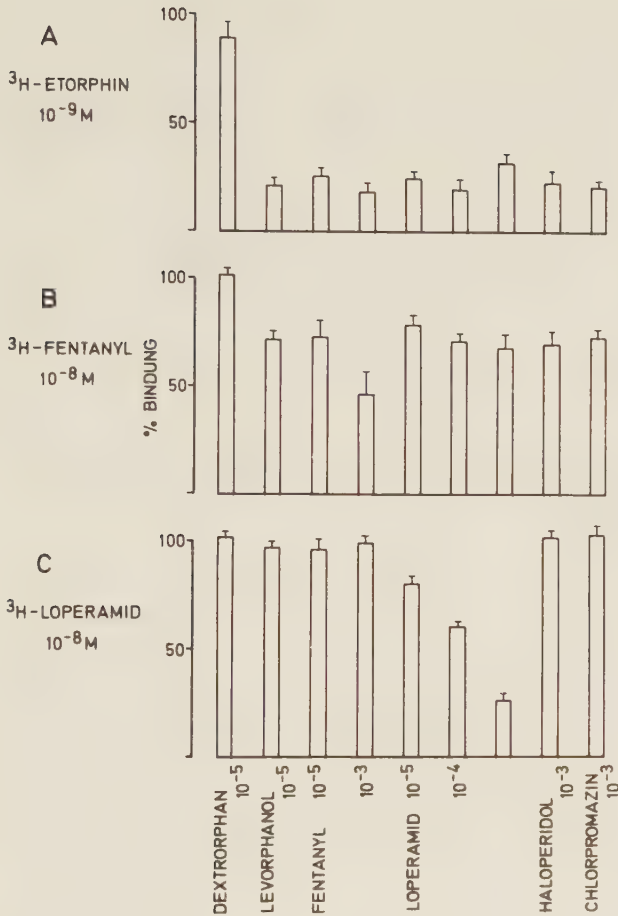


Abb. 18 Verdrängung markierter Opiate durch verschiedene Pharmaka aus stereospezifischen und unspezifischen Bindungsstellen im Rattengehirnhomogenat. 100% Bindung bezeichnet die im Gewebe gemessene Radioaktivität in Abwesenheit jedes Inhibitors. Weitere Erläuterungen siehe Text. Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Chlorpromazin getestet. Diese Substanzen bewirken in Konzentrationen über 10^{-5} M eine Hemmung der stereospezifischen Bindung (Abb. 18 A und 18 B), wie sie bereits von Creese et al. (1976) beschrieben wurde. Eine Wirkung dieser Substanzen auf die unspezifische Bindung ist nicht zu erkennen.

Es erscheint, als wäre die Bindung von ^3H -Loperamid zum Gewebe ein spezifisches Charakteristikum dieser Substanz, indem es sich um eine sättigbare Bindungsstelle von hoher Kapazität handelt, um die die anderen getesteten Pharmaka nicht konkurrieren.

2.6.3. Charakterisierung der ^3H -Loperamidbindung durch Tenside

Um die Bindung von ^3H -Loperamid näher zu charakterisieren, wurde der hemmende Effekt verschiedener Detergentien auf Bindungsstudien untersucht. Diese Substanzen heben in Konzentrationen von 0.1 - 1% die stereospezifische Bindung der Opiate auf (Simon et al., 1974) möglicherweise durch Denaturierung des Rezeptorproteins oder Inaktivierung eines für die Bindung essentiellen Lipids (Loh et al., 1975). In Abbildung 19 A und B wird durch hohe Tensidkonzentrationen (10^{-3} M) die Bindung von ^3H -Etorphin und ^3H -Fentanyl in dem Maße reduziert, wie es dem in Abbildung 16 demonstrierten stereospezifisch gebundenen Anteil entspricht. Ein Einfluß auf die nicht am Rezeptor gebundene Substanz wird bei den getesteten Dosen für ^3H -Etorphin nicht beobachtet; die Konzentration an ^3H -Fentanyl wird nur durch Tween 80 um 60% reduziert.

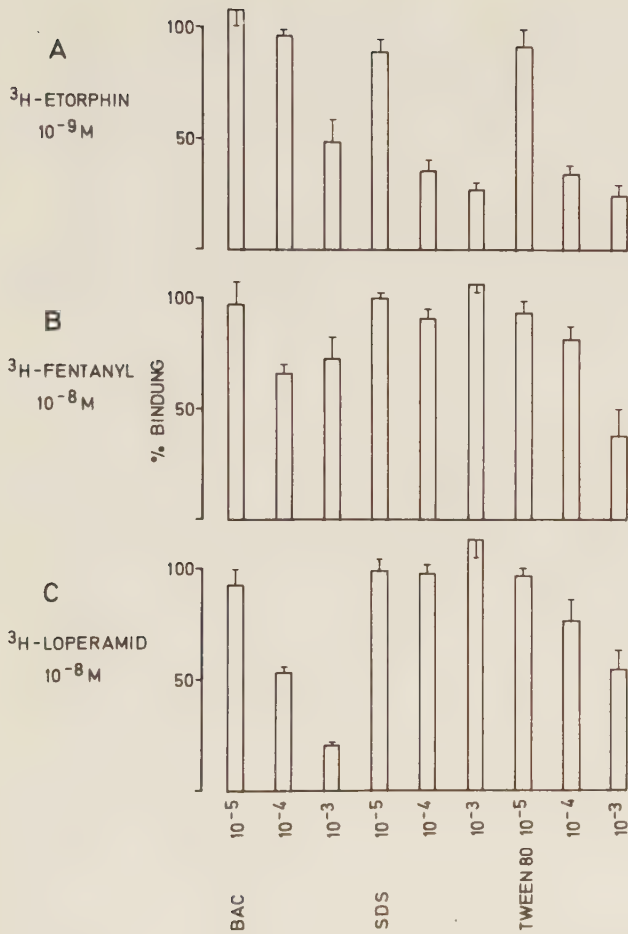


Abb. 19 Bindungshemmung verschiedener markierter Opiate durch Detergentien. Weitere Erläuterungen siehe Text und Abb. 18.

Die Wirkung von Tween 80 auf die Bindung von ^3H -Loperamid (Abb. 19 C) ist deutlich schwächer, es zeigt sich aberein starker, dosisabhängiger Effekt von Benzalkoniumchlorid (BAC), der auch quantitativ mit der Wirkung von Loperamid in Abbildung 18 C vergleichbar ist. Befunde mit einem zweiten kationenaktiven Tensid (Cetylpyridiumchlorid) entsprechen den für BAC erhobenen (nicht abgebildet). Natriumlaurylsulfat (SDS) als anionenaktives Tensid ist ohne Einfluß. Es handelt sich bei der Erniedrigung der Bindung durch die kationenaktiven Detergentien um eine Verdrängung von ^3H -Loperamid von anionischen Zentren im Gewebehomogenat, und nicht um die Bildung leicht auswaschbarer Komplexe oder Mizellen. Hinweis dafür geben Kontrollexperimente, die unter identischen Bedingungen, aber in Abwesenheit des Gewebehomogenats durchgeführt wurden. In diesen Versuchen wurde also nur die Filterbindung von ^3H -Loperamid und deren Beeinflussung durch Tenside ermittelt. Durch SDS (10^{-3}M) wird die im Glasfaserfilter gebundene Radioaktivität um 95% verringert, die kationenaktiven Tenside bewirken eine Reduzierung um weniger als 10%.

3. Diskussion

Die Bindungsstudien zeigen, daß die synthetischen Antidiarrhoika Affinität zum Opiatrezeptor besitzen; die hier mitgeteilten Daten ergänzen früher erhobene Befunde (Terenius, 1975; Wüster und Herz, 1976; Mackerer et al., 1976; Wüster und Herz, 1977) und zeigen, daß die Rezeptoraffinitäten von Loperamid und einigen seiner Derivaten im Bereich der stark wirksamen narkotischen Analgetika liegen (Tab. 2); der hohe "Natriumquotient" kennzeichnet die Substanzen als Agonisten (Pert et al., 1973; Pert und Snyder, 1974).

Als mögliche Ursache der spezifischen Wirkung auf den Darmtrakt war u.a. eine unterschiedliche Affinität der Antidiarrhoika zu peripheren und zentralen Opiatrezeptoren erwogen worden. Für die narkotischen Analgetika, wie auch für die Antidiarrhoika, ergaben die vorliegenden Untersuchungen jedoch keine Unterschiede in der stereospezifischen Bindung an Gehirn- und Darmhomogenat. Dies deutet darauf hin, daß die Rezeptoren in den beiden Organen zumindest eine sehr ähnliche Struktur haben; die selektive Darmwirksamkeit der Antidiarrhoika kann demnach nicht durch eine Wirkung auf eine spezielle Population an Opiatrezeptoren im Intestinaltrakt erklärt werden.

Das weitgehende Fehlen einer zentralen Wirksamkeit der Antidiarrhoika muß vielmehr durch die besondere Pharmakokinetik der Antidiarrhoika erklärt werden. Selbst bei intravenöser Injektion, eine Applikationsform, bei der in der Regel sehr günstige Voraussetzungen für eine zentrale Wirksamkeit gegeben sind, läßt

sich eine antinozizeptive Wirkung nur mit subtoxischen oder toxischen Dosen erreichen. Hierbei finden sich im Gehirn nur sehr geringe Konzentrationen an unveränderter Substanz; sie liegen 4-6 mal niedriger als die Blutkonzentrationen. Die offensichtlich schlechte Permeation durch die Blut-Gehirn-Schranke ist schwer verständlich im Hinblick auf den lipophilen Charakter des Loperamidmoleküls; selbst bei dem erheblich hydrophileren Morphin wird in den entsprechenden Versuchen eine 4-fach höhere Konzentration erreicht. Die autoradiographische Untersuchung der Ausbreitung intraventrikulär applizierten Loperamids läßt darauf schließen, daß die Substanz schlecht durch biologische Membrane permeiert. Es muß vermutet werden, daß dies auch für die Blut-Gehirn-Schranke gilt und mit der hohen Oberflächenaktivität der Substanz in Zusammenhang steht.

Eine zusammenfassende Betrachtung der die zentrale Wirksamkeit bestimmender Faktoren - Rezeptoraffinität, Permeation der Substanz in das Gehirn, antinozizeptive Wirkung (Tab. 9) zeigt, daß sich Loperamid in dieser Hinsicht durchaus wie ein typisches Opiat verhält. Die ED_{50} für die analgetischen Effekte von Loperamid und Morphin sind direkt vergleichbar; so wird die 5-fach höhere Rezeptoraffinität von Loperamid durch eine 6,5-fach niedrigere Konzentration im ZNS in etwa wieder ausgeglichen. Die Antidiarrhoika erscheinen demnach in ihrer Wirkung am zentralen Morphinrezeptor als narkotisches Analgetikum, ihre Besonderheit liegt in dem erschwerten Zutritt zum Gehirn.

Tabelle 9

	Rezeptor- affinität IC ₅₀ (Tris HCl + NaCl)	antino- zizeptive Wirkung ED ₅₀ mg/kg	entsprechende Konzentration im Gehirn µg pro g
Loperamid	31	1.9	0.07
Morphin	160	2.3	0.45
Morphin	5.2	1.2	6.4
Loperamid			

Eine Besonderheit in der Kinetik der Antidiarrhoika stellt die Akkumulation von ³H-Loperamid in der Darmwand nach intravenöser Injektion dar. Die hohe Ausscheidung über die Galle und Rückresorption in den Darm (Heykants et al., 1974) mag hierbei eine Rolle spielen. Ein solcher enterohepatischer Kreislauf wurde auch bei Morphin beobachtet (Walsh und Levine, 1975). Der hauptsächliche Unterschied zwischen den beiden Substanzen scheint aber in der unterschiedlich starken Resorption aus dem Intestinaltrakt zu liegen. Nach oraler Gabe, der Applikationsform, bei welcher die selektiv konstipierende Wirkung der Antidiarrhoika besonders ausgeprägt ist (P.A.J. Janssen, persönliche Mitteilung), verbleiben die Substanzen im Darm. Die schlechte Resorption führt zu niedrigen Substanzkonzentrationen im Blut (Karim und Heykants, 1976); dazu kommt noch zusätzlich eine schnelle Metabolisierung außerhalb des Magen-Darm-Traktes.

Zur Erklärung des ungewöhnlichen pharmakokinetischen Verhaltens des Loperamids bietet sich die bei den

untersuchten Antidiarrhoika gefundene Grenzflächenaktivität an, durch welche sich diese Substanzen von den narkotischen Analgetika unterscheiden. So wird eine schlechte Resorption nach oraler Applikation auch für andere grenzflächenaktive Pharmaka, wie z.B. Clorpromazin (Sundaesan und Rivera-Calimlim, 1975) oder Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Garrett und Hunt, 1974) beschrieben. Im Falle der Antidiarrhoika ist dieser Effekt aber durchaus erwünscht; so führt die Akkumulation der Substanzen an den biologischen Membranen der Darmwand zu einer lang anhaltenden lokalen Wirksamkeit und nur wenig wird resorbiert. Der tensidartige Charakter der Antidiarrhoika kommt auch in dem besonderen Verhalten der Substanzen im Radiorezeptorassay und am isolierten Organ zum Ausdruck. So wird wahrscheinlich der langsame Einsatz und die im Vergleich zur Rezeptoraffinität sehr starke Wirksamkeit an der Längsmuskelpräparation durch die Anreicherung der Substanzen im Gewebe verursacht. Der erreichte pharmakologische Effekt ist durch Waschen nicht mehr aufzuheben; daß es sich hierbei nicht um die Folge einer besonderen Rezeptorbindung handelt, zeigt die Antagonisierbarkeit durch Naloxon. Ursache ist demnach eine hohe unspezifische Affinität der Substanzen im Gewebe. So tritt die Hemmung in Abbildung 6 nach Auswaschen des Antagonisten schneller ein als der ursprünglich beobachtete langsame Wirkungseinsatz, Hinweis dafür, daß sich das Pharmakonmolekül bereits in der unmittelbaren Umgebung der "receptor site" befindet.

Die leichte Antagonisierung der Loperamid-Rezeptor Interaktion durch Naloxon an der Längsmuskelpräparation ist im Radiorezeptorassay nicht als eine

Verdrängung von ^3H -Loperamid demonstrierbar, die stereospezifische Bindung der Substanz wird hier durch die hohe Affinität zum Gewebe maskiert. Aus diesen Studien ist aber ersichtlich (Abb. 18), daß die Adsorption an biologische Membranen ein spezielles Charakteristikum der Antidiarrhoika darstellt, es handelt sich um eine sättigbare Bindung, aus der ^3H -Loperamid durch narkotische Analgetika nicht verdrängt werden kann. Dagegen läßt die selektive Fähigkeit der kationenaktiven Detergentien (BAC, CPC) Loperamid zu verdrängen, darauf schließen, daß es sich bei der unspezifischen Bindung der Substanz um die Folge einer Interaktion eines kationischen Tensids mit anionischen Gruppen im Gewebe handelt.

Wegen ihrer Fähigkeit, Opiate stereospezifisch zu binden, hat man verschiedene Lipide wie z.B. Cerebrosid-Sulfatide (Loh et al., 1974) oder Phosphatidylinosit (Abood und Hoss, 1975) als die mögliche molekulare Struktur des Opiatrezeptors angenommen. Obwohl bis jetzt nicht geklärt ist, ob es sich bei den Sulfatiden/Phosphatiden um die gesuchte Bindungsstelle des Opiatrezeptors handelt, ist es eine naheliegende Spekulation, die anionischen Zentren dieser Lipide als den Ort der unspezifischen Loperamidbindung anzunehmen.

4. Experimenteller Teil

4.1. Verwendete Materialien und Substanzen

Synthetische Antidiarrhoika: (Janssen Pharmaceutica,
Beerse)

Loperamid,	4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxi-N,N-dimethyl- α,α -diphenyl-1-piperidin-butanamid HCl
Fluperamid,	4-(4-Chloro- α,α,α -trifluoro-m-tolyl)-4-hydroxi-N,N-dimethyl- α,α -diphenyl-1-piperidin-butanamid HCl
R 21 345,	4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxi-N-methyl- α,α -diphenyl-1-piperidin-butanamid HCl
R 20 905,	4-(4-Chlorphenyl)-4-hydroxi- α,α -diphenyl-1-piperidin-butanamid HCl
R 18 936,	4-Phenyl-4-hydroxi-N,N-dimethyl- α,α -diphenyl-1-piperidin-butanamid
R 18 861,	4-Phenyl-4-hydroxi-1-piperidiny- α,α -diphenyl-1-piperidin-butanamid HCl
Diphenoxylat,	Äthyl-1-(3-Cyano-3,3-diphenylpropyl)-4-phenyl-4-piperidincarboxylat HCl
Difenoxin,	1-(3-Cyano-3,3-diphenylpropyl)-4-phenyl-4-piperidincarboxylsäure HCl

andere Pharmaka:

Morphin HCl (Merck, Darmstadt)

Dextrorphan d-tartrat-monohydrat und

Levorphanol-1-tartrat-dihydrat (Hoffmann-La Roche,
Grenzach)

Etorphin (Reckitt & Colman, Kingston-upon-Hull)

Fentanyl dihydrogenzitat (Janssen Pharmaceutica,
Beerse)

Methadon HCL (Farbwerke Hoechst, Frankfurt/M)
Naloxon HCL (Ende Laboratories, New York)
Haloperidol (Janssen Pharmaceutica, Beerse)
Chlorpromazin HCL (Bayer, Leverkusen)

radioaktiv markierte Substanzen:

^3H -Morphin (28 Ci/mMol) und
 ^3H -Etorphin (41 Ci/mMol), The Radiochemical Centre,
Amersham)
 ^3H -Loperamid (9 Ci/mMol) und
 ^3H -Fentanyl (10 Ci/mMol, Janssen Pharmaceutica, Beerse)
 ^3H -Naloxon (23,6 Ci/mMol, New England Nuclear, Boston)

Die radiochemische Reinheit der Substanzen wurde dünn-
schichtchromatographisch geprüft. Sie lag zwischen 90
und 99,5%.

Alle weiteren, nicht eigens aufgeführten Chemikalien
stammen von der Firma E. Merck, Darmstadt.

Die Lösungen werden, wenn nicht anders vermerkt, mit
doppelt glasdestilliertem Wasser hergestellt, Injek-
tionslösungen mit physiologischer Kochsalzlösung. Die
Konzentrationsangaben bei Injektionslösungen beziehen
sich auf das Gewicht der freien Basen.

Wegen der schlechten Löslichkeit der Antidiarrhoika
in Wasser (Tab. 7) werden diese zuerst in Propylengly-
kol gelöst und mit Wasser auf das Endvolumen verdünnt.
Die Konzentration des Lösungsvermittlers liegt stets
unter 10%. Kontrollversuche zeigen, daß diese Menge ohne
Einfluß auf die verschiedenen Versuche ist, außer bei
der Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften,
bei denen die Lösungen deshalb ohne Hilfsmittel be-
reitet werden müssen.

4.2. Apparate, Geräte, Hilfsmittel

4.2.1. Radiorezeptorassay

Vakuumpumpe, Vakuubrand, RD4; Brand, Wertheim.

Filtrationsgerät; Sartorius, Göttingen.

Filter, Whatman GF/B 28 mm Ø; Vetter, St.Leon-Rot 2.

Schüttelinkubator, Köttermann 3047; Köttermann, Hänigsen.

4.2.2. Längsmuskelpräparation

Reizgeräte, Farnell Physiological Stimulator;
Dressler Elektronik, Berlin.

Kraftaufnehmer und Vorverstärker, HBM Q 11 und
KWS 3071; Hottinger Baldwin Meßtechnik, Darmstadt.

Schreiber, Rikadenki Mark II; Hellige, München.

Thermostat, Ultrathermostat K5; Colora, München.

4.2.3. Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften

Tensiometer, La Comte de Noüy-Tensiometer, Krüss,
Hamburg.

Spektralphotometer, Zeiss Modell M4Q II; Zeiss AG.,
Oberkochem.

Titriereinrichtung, Titrator TTT 1c, Titrigraph SBR 2c,
Autobürette ABU 1b; Radiometer, Kopenhagen.

4.2.4. Sonstiges

Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, Tri-Carb Modell 3390 (mit angeschlossenem AAA Computer, Modell 544) und Modell 2450; Packard Instruments, Frankfurt/M.

Probenverbrennungsautomat, 306 Oxidiser; Packard Instruments, Frankfurt/M.

Zentrifugen, Sorvall RC 2B, RC 5 und GLC 1; Vetter, St.Leon-Rot 2.

pH-Meter, Orion Modell 601; Colora, München.

Schüttelmaschine, EM 8; Bühler, Tübingen.

Dünnschichtchromatographie, Desaga, Heidelberg.

Mikroliterspritzen, Hamilton; über Bachofer, Reutlingen.

Mikroliterpipetten, Eppendorf und Finn-Pipetten; über Schultheiss, München.

Tischrechner, 9810 A Calculator; Hewlett Packard, München.

Rotationsverdampfer, Rotavapor RE; Büchi, über Colora, München.

Fraktionssammler, LKB - Ultrarak 7000; LKB Produkter, Stockholm.

Schlauchpumpe, LKB - Multiperpex 2115; LKB Produkter, Stockholm.

Gefriertrocknung, Virtis Freeze Mobil; Virtis New York.

4.2.5. Tiere

1. Ratten, Sprague-Dawley, männlich, ca. 200 g schwer,
2. Mäuse vom N.M.R.I.-Stamm, männlich, ca. 20 g,
3. Meerschweinchen, Hartley, männlich, 450-550 g.
alle von Firma Jauz, Kissleg.

4.3. Methoden

4.3.1. Radiorezeptorassay

Ratten werden mittels mechanischer Hilfsmittel getötet und das Gehirn entnommen. Mehrere Gehirne ohne Cerebella werden gepoolt, in entsprechendem Puffer (Tris HCl 50 mM oder Tris HCl 50 mM + NaCl 100 mM, pH 7.4) nach der Potter-Elvehjem Technik homogenisiert (10 Auf- und Abbewegungen bei 750 rpm). Mit Puffer wird auf eine Endkonzentration von 1:100 (Gewebe/Puffer) verdünnt. Der Proteingehalt des Homogenates, der serienmäßig mitbestimmt wird (Lowry et al., 1951) liegt zwischen 0.1 und 0.2%.

Die folgenden Schritte werden jeweils im dreifachen Ansatz durchgeführt: 2 ml-Anteile werden bei 25°C mit dem unmarkierten Inhibitor vorinkubiert, und nach Zugabe der Tracersubstanz (^3H -Naloxon, Endkonzentration im Ansatz $2.5 \times 10^{-9}\text{M}$) weitere 15 Minuten unter Schütteln inkubiert. Danach wird jede Probe einzeln unter Vakuum durch Glasfaserfilter filtriert (Whatman GF/B, 2.8 cm Ø) und zweimal mit eiskaltem Puffer nachgespült. Die Filterscheiben werden in Zählgefäßen 2 Stunden in 10 ml Unisolve I (Zinsser) geschüttelt,

um das Gewebe aufzulösen, dann wird die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen (Packard Tri-Carb 8890). Die Ergebnisse aus den 3 parallelen Ansätzen werden jeweils gemittelt.

Bindungsstudien zur Bestimmung der Opiatrezeptoraffinitäten im Plexus Myentericus werden entsprechend durchgeführt. Das Homogenat wird aus der Längsmuskelpräparation (4.2.2.) mittels eines Ultra Turrax (1 min, maximale Geschwindigkeit) hergestellt. Die Inkubationsbedingungen in diesen Versuchen sind: Krebs-Ringer-Tris-Puffer (NaCl, 118 mM; KCl, 4.75; CaCl₂, 2.54; Mg SO₄, 1.2; Tris HCl 25 mM, pH 7.4); Temperatur 37°C; ³H-Etorphin als Tracer (Endkonzentration in der Probe: 0.5 nM).

4.3.2. Präparation des isolierten Organs

Meerschweinchen wird das Ileum entnommen und der Längsmuskel mit anhaftendem Plexus myentericus präpariert (Rang, 1964). Dazu wird das Ileum über einen Glasstab gezogen, mittels eines Skalpells der Muskel beiderseits des Mesenteriums eingeschnitten und die Längsmuskelpräparation mit einem Wattebausch vom darunterliegenden Zirkulärmuskel abgestreift. Ein etwa 5 cm langes Gewebestück wird dann zu einer Schlaufe gebunden und, wie bei Schulz und Goldstein (1972) beschrieben, im Organbad aufgehängt. Die Krebs-Ringer-Lösung des Organbades hat die Zusammensetzung: NaCl, 118 mM; KCl 4.75; CaCl₂ 2.54; KH₂PO₄ 1.19; Mg SO₄, 120; NaHCO₃ 25.0; außerdem: Glukose 11 mM, Cholinchlorid 20 µM und Mepyraminmaleat (0.125 µM). Das

Bad wird von Carbogen (95% O₂/5% CO₂) durchströmt, die Temperatur beträgt 37°C. Muskelkontraktionen werden durch supramaximale Feldstimulation (80 V, 0.1 Hz, 0.5 msec) induziert. Nach dem Befestigen der Präparation im Organbad wird diese unter elektrischer Stimulation ca. 1 Stunde in 5 Minutenintervallen gewaschen, bis eine regelmäßige Muskelkontraktion erreicht ist.

4.3.3. Messung der antinozizeptiven Effekte

Die antinozizeptiven Effekte werden mit Hilfe eines Vokalisationstestes (Carrol und Lim, 1960) untersucht. Die Ratten bzw. Mäuse sitzen in Röhren, die ihre Bewegungsfreiheit einschränken, der Schwanz ragt aus der Röhre heraus. Die Schwanzwurzel wird über eine Doppelelektrode nach Lukner und Magun (1951) elektrisch gereizt. Dazu wird ein Stimulator benutzt, welcher Rechteckimpulse konstanter Stromstärke liefert. Gereizt wird für jeweils 2 Sekunden (Impulsdauer 10 msec). Die Stromstärke, auf einem Ampèremeter abgelesen, wird stufenweise bis maximal 2000 µA erhöht. Ermittelt wird die Stromstärke, die eine Vokalisation während des Reizes auslöst.

Intraventrikuläre Injektion: 10 Tage vor der Bestimmung antinozizeptiver Effekte wird bei Ratten unter Pentobarbitalnarkose eine Führungskanüle in den Seitenventrikel (für einige Experimente in den 4. Ventrikel) implantiert (Laschka et al., 1976). Sie wird in die Schädeldecke eingeschraubt und zusätzlich mit Zahnzement befestigt, die Öffnung wird

bis zum Versuchstag mit Kautschuk verschlossen.

Die zu testenden Substanzen werden in 25 µl Injektionsvolumen mittels einer Hamilton-Spritze appliziert.

4.3.4. Pharmakokinetik

1. Gesamtaktivitäten: Die markierten Substanzen (5 µCi) werden intravenös in die Schwanzvene bei Mäusen injiziert, die Tiere nach der entsprechenden Zeit getötet und die einzelnen Organe entnommen. Magen und Dünndarm werden aufgeschnitten und durch kurzes Schwenken in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung vom Inhalt befreit. Alle zu bestimmenden Gewebe werden in "Combusto-Cones" (Packard Instruments) eingewogen und sofort im 306 Oxidizer (Packard Instruments) in einer Sauerstoffatmosphäre verbrannt. Freiwerdendes Tritium wird als $^3\text{H}_2\text{O}$ aufgefangen und nach Zugabe von 10 ml Monophase (Packard) im Szintillationszähler gemessen.
2. Unveränderte Substanz: 1 g Blut, Gehirn oder Dünndarm werden im Ultra Turrax (1 min, maximale Geschwindigkeit) in 10 ml einer Mischung von Methanol/Wasser/Essigsäure (30:20:1, v/v/v) unter Zugabe von 10 mg unmarkiertem Loperamid homogenisiert. Nach Alkalisieren mit Ammoniak auf pH 9.0 werden die Proben zweimal mit 30 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und auf Dünnschichtplatten aufgetragen (Merck Kieselgel 60 HF 254). Nach

dem Entwickeln in Äthylazetat/Äthanol/25% Ammoniak (90:10:1, v/v/v) werden die Flecken in einer Jod-Atmosphäre sichtbar gemacht. Unverändertes Loperamid, $R_f = 0.42$, wird abgekratzt und durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Verluste bei der Extraktion sowie verminderte Zählausbeuten durch "Quenching" werden durch externe Standardisierung korrigiert.

4.3.5. Bestimmung der physiko-chemischen Eigenschaften

1. Verteilungskoeffizient: Die Verteilung der Substanzen zwischen Heptan und 0.2 M Phosphatpuffer (pH 7.4) wird bei 20°C bestimmt. Der Verteilungskoeffizient errechnet sich aus dem Verhältnis "Substanzkonzentration in der Lipoidphase" zu "Substanzkonzentration im Puffer". Die beiden Medien (1:1) werden vor Einbringen der Testsubstanzen 1 Stunde geschüttelt, danach durch Zentrifugation getrennt. Die zu bestimmenden Opiate werden im Puffer gelöst, dieser erneut mit der organischen Phase geschüttelt (1 Stunde), dann werden die Substanzkonzentrationen in der wässrigen und Lipoidphase photometrisch oder, bei markierten Substanzen, im Szintillationszähler gemessen.
2. pK-Wert: Die Lösung des Opiates in 0.01 M HCl wird potentiometrisch mit 0.01 M NaOH in einer automatischen Titriereinrichtung Radiometer (Kopenhagen) titriert (Titrator TTT 1c; Titrigraph SBR 2c; Autobürette ABU 1b mit 2.5 ml). Als Blindversuch dient die Titration der verwendeten 0.01 M HCl. Aus den Titrationskurven im Haupt- und Blindversuch

wird die Differenzkurve ermittelt, aus deren Wendepunkt der pK-Wert abgelesen werden kann.

3. Plasmaproteinbindung: Die Gleichgewichtsdialyse wird in Zellen durchgeführt, die durch Zellulosemembranen (Visking Dialyseschlauch 20/32) in zwei Kammern getrennt werden. Die Zellen (1.5 ml) werden jeweils mit 750 μ l Proteinlösung (Humanplasma) und Puffer (0.13 M Phosphatpuffer pH 7.4) gefüllt; die radioaktiv markierten Opiate werden dem Puffer zugesetzt. Bis zur Einstellung eines Substanzgleichgewichts zwischen den beiden Medien werden die Kammern im Luftbad bei 37°C rotiert. Die Anteile der gebundenen Substanz (β -Wert) werden berechnet wie bei Höllt und Teschemacher (1975) beschrieben.
4. Grenzflächenaktivität: Die Fähigkeit der verschiedenen Substanzen, die Oberflächenspannung eines Krebs-Ringer-Tris Puffers (pH 7.4) zu verringern, wird im Tensiometer nach Le Comte de Noüy ermittelt (Krüss). Grenzflächenaktivitäten werden bei 20°C $\pm$ 1 gemessen. Als erniedrigte Oberflächenspannung wird die Größe angenommen, bei der drei Bestimmungen über 1 Minute einen konstanten Wert ergeben.

Autoradiographie: Die Gehirnschnitte der autoradiographischen Untersuchungen in 2.3.3. wurden dankenswerterweise von Frau Dr. E. Laschka angefertigt.

4.3.6. Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AcCH	Acetylcholin
BAC	Benzalkoniumchlorid (Zephirol ^R)
Ci	Curie
CPC	Cetylpyridiumchlorid
cpm	counts per minute (gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute)
dpm	desintegrations per minute (tatsächliche radioaktive Zerfälle pro Minute)
ED ₅₀	Dosis, mit der ein halbmaximaler Effekt erreicht wird
h	Stunde
IC ₅₀	Konzentration, die einen halbmaximalen, inhibitorischen Effekt verursacht
LD ₅₀	Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
min	Minute
SDS	Natriumlaurylsulfat
Tris	Tris (hydroxymethyl) - aminomethan
ZNS	zentrales Nervensystem

5. Literaturverzeichnis

- Abood, L.G., and Hoss, W.: Stereospecific morphine absorption to phosphatidyl serine and other membrane compounds of brain. *Europ. J. Pharmacol.* 32, 66-75 (1975)
- Adler, T.K.: CNS localisation, biological disposition and analgesic action of morphine and codeine after intraventricular injection in mice. *Fed. Proc.* 23, 283 (1964)
- Bass, P., and Wiley, J.N.: Electrical and extraluminal contractile force activity of the dog. *Amer. J. Dig. Dis.* 10, 183-200 (1965)
- Beckett, A.H.: Analgesics and their antagonists: Some steric and chemical considerations. *J. Pharm. Pharmacol.* 8, 848-859 (1956)
- Birdsall, N.J.M., Hulme, E.C., Bradbury, A.F., Smith, D.G., and Snell, C.R.: The binding of the C-fragment of lipotropin and methionine-enkephalin to brain opiate receptors. In: *Opiates and endogenous opioid peptides*, herausgegeben von H.W. Kosterlitz, Elsevier/North Holland Amsterdam, pp. 19-26 (1976)
- Bläsigg, J., Höllt, V., Herz, A., and Paschelke, G.: Comparison of withdrawal precipitating properties of various morphine antagonists and partial agonists in relation to their stereospecific binding to brain homogenates. *Psychopharmacol.* 46, 41-51 (1976)
- Brodie, B.B.: Physico-chemical factors in drug absorption. T.B. Binns, Ed. *Absorption and distribution of drugs*. Livingstone, Edinburgh, 16-48 (1964)
- Burks, T.F., and Long, J.P.: Release of intestinal 5-hydroxytryptamine by morphine and related agents. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 156, 267-275 (1967)

- Burks, T.F.: Acute effects of morphine on rat intestinal motility. *Europ. J. Pharmacol.* 40, 279-283 (1976)
- Butler, D.E., Meyer, R.F., Alexander, S.M., Bass, P., and Kennedy, J.A.: Synthetic antidiarrheal agents. I. An approach to the separation of antidiarrheal activity from narcotic analgesic activity. *J. Med. Chem.* 16, 49-54 (1973)
- Carrol, M.N., and Lim, R.K.S.: Observations on the neuropharmacology of morphine and morphine-like analgesics. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 125, 135-147 (1960)
- Colpaert, F.C., Nimeegers, C.J.E., Lal, H., and Janssen, P.A.J.: Investigation on drug produced and subjectively experienced discriminative stimuli. *Life Sci.* 16, 717-728 (1975)
- Colquhoun, D., and Ritchie, J.M.: The kinetics of the interaction between tetrodotoxin and mammalian non-myelinated fibres. *Mol. Pharmacol.* 8, 285-292 (1972)
- Colquhoun, D.: The relation between classical and co-operative models for drug action. In: *Drug receptors*, herausgegeben von H. Rang, McMillan Press, London (1973)
- Costa, M., and Furness, J.B.: The peristaltic reflex: An analysis of the nerve pathways and their pharmacology, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 294, 47-60 (1976)
- Cox, B.M., and Weinstock, M.: The effect of analgesic drugs on the release of acetylcholine from electrically stimulated guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 27, 81-92 (1966)
- Creese, I., and Snyder, S.H.: Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea-pig intestine. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 195, 205-219 (1975)

- Creese, I., Feinberg, A.P., and Snyder, S.H.:
Butyrophenone influences on opiate receptor binding.
Europ. J. Pharmacol. 36, 231-235 (1976)
- Cuatrecasas, P.: Insulin-receptor interactions in
adipose tissue cells: Direct measurement and pro-
perties. Proc. nat. Acad. Sci. 68, 1264-1268 (1971)
- Dajani, E.Z., Roge, E.A.W., and Bertermann, R.E.:
Effects of E-prostaglandins, diphénoxylate and
morphine on intestinal motility in vivo. Europ. J.
Pharmacol. 34, 105-113 (1975)
- De Oliveira, L.F., and Bretas, A.D.: Blockade by
bufotenidine of the contractile response of the
intestine of dog in vivo to serotonin (5-HT) and
narcotic analgesics. Europ. J. Pharmacol. 21, 369-
377 (1973)
- Elde, R., Hökfeldt, T., Johansson, O., and Terenius, L.:
Immunohistochemical studies using antibodies to
leucine-enkephalin: initial observations on the
nervous system of the rat. Neuroscience 1, 349-357
(1976)
- Garrett, E.R., and Hunt, C.A.: Physicochemical properties,
solubility, and protein binding of ⁹-Tetrahydro-
cannabinol. J. Pharm. Sci. 63, 1056-1064 (1974)
- Goldstein, A.: The interaction of drugs and plasma
proteins. Pharmacol. Review 1, 102-110 (1949)
- Goldstein, A., Lowney, L.I., and Pal, B.K.: Stereospe-
cific and nonspecific interactions of the morphine
congener levorphanol in subcellular fractions of
mouse brain. Proc. nat. Acad. Sci. 68, 1742-1747 (1971)
- Goldstein, A., and Schulz, R.: Morphine-tolerant long-
itudinal muscle strip from guinea-pig ileum. Brit.
J. Pharmacol. 48, 655-666 (1973)
- Goldstein, A., Aronow, L., and Kalman, S.N.: Drug action,
the basis of pharmacology. J. Wiley, New York (1974)

- Goodman, A.L.: Use of diphenoxylate hydrochloride in the withdrawal period of narcotic addiction, a preliminary report. South. Med. J. 61, 313-316 (1968)
- Gyang, E.A., and Kosterlitz, H.W.: Agonist and antagonist actions of morphine-like drugs on the guinea-pig isolated ileum. Brit. J. Pharmacol. 27, 514-527.
- Herz, A., Albus, K., Metyš, T., Schubert, P., and Teschemacher H.J.: On the central sites for the antinociceptive action of morphine and fentanyl. Neuropharmacol. 9, 539-551 (1970)
- Herz, A., and Teschemacher, H.J.: Activities and sites of antinociceptive action of morphine-like analgesics and kinetics of distribution following intravenous. Adv. Drug Research 6, 79-119 (1971)
- Hess, R., Herz, A., and Friedel, K.: Pharmacokinetics of fentanyl in rabbits in view of the importance for limiting the effect. J. Pharmacol. exp. Ther. 179, 474-484 (1971)
- Heykants, J.J.P., Lewi, P.J., and Janssen, P.A.J.: Difenoxin (R 15 403), the active metabolite of diphenoxylate (R 1132), Part 4: Distribution in the rat of diphenoxylate and difenoxine. Arzneimittelforsch. 22, 520-526 (1972)
- Heykants, J., Michiels, M., Knaeps, A., and Brugmans, J.: Loperamide (R 18 553), a novel type of antidiarrheal agent, Part 5: The pharmacokinetics of loperamide in rats and man. Arzneimittelforsch. 24, 1649-1661 (1974)
- Höllt, V., and Teschemacher, H.J.: Hydrophobic interactions responsible for unspecific binding of morphine-like drugs. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 163-177 (1975)

- Höllt, V., and Wüster, M.: Opiate receptors. In: Recent development in opiate research, M. Dekker, New York, Herz, A. Ed. im Druck (1977)
- Hoffmeister, F.: Tierexperimentelle Untersuchungen über den Schmerz und seine pharmakologische Beeinflussung. Editio Cantor Aulendorf (1968)
- Hughes, J.: Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. Brain Res. 88, 295-308 (1975)
- Hughes, J., Smith, T., Morgan, B., and Fothergill, L.: Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. Life Sci. 16, 1753-1760 (1975)
- Jaffe, J.H., and Martin, W.R.: Narcotic analgesics and antagonists. In: The pharmacological basis of therapeutics, 5. Ausgabe, herausgegeben von L.S. Goodman and A. Gilman, McMillan, London 1975)
- Janssen, P.A.J., Jageneau, A.H., and Huygens, J.: Synthetic antidiarrheal agents. I. Some pharmacological properties of R 1132 and related compounds. J. Med. Chem. 1, 299-308 (1959)
- Janssen, P.A.J.: Pain. Academic Press (London and New York) ed. A. Soulaire, J. Cahn, and J. Charpentier, pp. 233-238 (1968)
- Karim, A., and Heykants, J.: Metabolism of synthetic antidiarrheal drugs diphenoxylate, difenoxine, and loperamide. In: Synthetic antidiarrheal drugs, pp. 132-154, ed. by W. Van Bever, and H. Lal, M. Dekker Inc., New York.
- Kaufman, J.J., Semo, N.M., and Kosci, W.S.: Micro-electrometric titration measurement of the pK_a 's and partition and drug distribution coefficients of narcotics and narcotic antagonists and their pH and temperature dependence. J. Med. Chem. 18, 647-656 (1975)

- Korolkovas, A.: Essentials of molecular pharmacology. Background for drug design. Wiley-Interscience, New York (1970)
- Kosterlitz, H.W., and Watt, A.J.: Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists, with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone). Brit. J. Pharmacol. 33, 266-276 (1968)
- Kosterlitz, H.W., Lydon, R.J., and Watt, A.J.: The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoreceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. Brit. J. Pharmacol. 39, 398-406 (1970)
- Kosterlitz, H.W., Lord, J.A.H., and Watt, A.X.J.: Morphine receptor in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. In: Agonist and antagonist actions of narcotic analgesic drugs. ed: H.W. Kosterlitz, H.O.S. Collier, and J.E. Villareal. University Park Press, Baltimore, pp. 43-61 (1973)
- Kosterlitz, H.W., Leslie, F.M., and Waterfield, A.A.: Rates of onset and offset of action of narcotic analgesics in isolated preparations. Europ. J. Pharmacol. 32, 10-16 (1975)
- Kosterlitz, H.W., and Waterfield, A.A.: In vitro models in the study of structure-activity relationship of narcotic analgesics. Annual Rev. Pharmacol. 15, 29-47 (1975)
- Kuhar, M., Pert, C.B., and Snyder, S.H.: Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. Nature 245, 447-450 (1973)
- Laschka, E., Herz, A., and Bläsigg, J.: Sites of action of morphine involved in the development of physical dependence in rats. Psychopharmacol. 46, 133-139 (1976)

- Loh, H.H., Cho, T.M., Wu, Y.C., and Way, E.L.: Stereospecific binding of narcotics to brain cerebrosides. *Life Sci.* 14, 2231-2245 (1974)
- Loh, H.H., Cho, T.M., Wu, Y.C., Harris, R.A., and Way, E.L.: Opiate binding to cerebroside sulfate: A model system for opiate receptor interaction. *Life Sci.* 16, 1811-1818 (1975)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with folen-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- Lukner, M., and Magun, R.: Eine Methode zur quantitativen Prüfung analgetischer Wirkungen im Tierversuch. *Z. ges. exp. Med.* 117, 133-145 (1951)
- Mackerer, C.R., Clay, G.A., and Dajani, E.Z.: Loperamide binding to opiate receptor sites of brain and myenteric plexus. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 199, 131-140 (1976)
- Margolin, S., and Plekss, O.J.: A neurohumoral substance discharged into blood perfusate from isolated rabbit heads by intracerebral morphine. *Med. Pharmacol. Expts.* 12, 1-7 (1965)
- Nimegeers, C.J.E., Lenaerts, F.M., and Janssen, P.A.J.: Loperamide (R 18 553) a novel type of antidiarrheal agent, Part I. In vivo pharmacology and acute toxicity. Comparison with morphine, codeine, diphenoxylate and difenoxin. *Arzneimittelforsch.* 24, 1633-1636 (1974)
- Paton, W.D.M.: The response of the guinea-pig ileum to electrical stimulation by coaxial electrodes. *Proc. Physiol. Soc.* 127, 40P-41P (1955)
- Paton, W.D.M.: The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *Brit. J. Pharmacol.* 11, 119-127 (1957)

- Pert, C.B., and Snyder, S.H.: Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014 (1973a)
- Pert, C.B., and Snyder, S.H.: Properties of opiate receptor binding in rat brain. *Proc. nat. Acad. Sci.* 70, 1011-1014 (1973b)
- Pert, C.B., Pasternak, G., and Snyder, S.H.: Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* 182, 1357-1361 (1973)
- Pert, C.B., and Snyder, S.H.: Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium. *Mol. Pharmacol.* 10, 868-879 (1974)
- Pert, C.B., Pert, A., Tallman, J.F.: Isolation of a novel endogenous opiate analgesic from human blood. *Proc. nat. Acad. Sci.* 73, 2226-2230 (1976)
- Rang, H.P.: Stimulant actions of volatile anaesthetics on smooth muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 22, 356-365 (1965)
- Reynolds, A.K., and Randall, L.O.: Morphine and allied drugs. University of Toronto Press, Toronto (1957)
- Rinaldo, J.A., Orinon, E.A., Simpelo, R.N., Check, F.E., and Beauregard, W.: Differential responses of longitudinal and circular muscles of intact canine colon to morphine and bethanechol. *Gastroenterology* 60, 438-444 (1971)
- Scholtan, W.: Über die Bindung der Langzeitsulfonamide an Serumeiweißkörper. *Makromol. Chem.* 54, 24-59 (1962)
- Schulz, R., and Goldstein, A.: Inactivity of narcotic glucuronides as analgesics and on guinea-pig ileum. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 183, 404-410 (1972)
- Schulz, R., and Herz, A.: Aspects of opiate dependence in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Life Sci.* 19, 1117-1128 (1976a).

- Schulz, R., Wüster, M., Simantov, R., Snyder, S., and Herz, A.: Electrically stimulated release of opiate-like material from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. *Europ. J. Pharmacol.* 41, 347-348 (1977).
- Schulz, R., and Wüster, M.: Renal excretion of endogenous opioids. *Europ. J. Pharmacol.*, ~~in~~ Druck (1977)
- Schulz, R., Wüster, M., and Herz, A.: Detection of a long acting endogenous opioid in blood and small intestine, *Life Sci.*, 21, 105-116 (1977).
- Schubert, P., Teschemacher, H.J., Kreutzberg, G.H., and Herz, A.: Intracerebral distribution patterns of morphine and morphine-like substances after intraventricular and local injection. *Histochemie* 22, 277-283 (1970)
- Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, J.: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ³H-etorphine to rat brain homogenate. *Proc. nat. Acad. Sci.* 70, 1947-1949 (1973)
- Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I., Groth, J., and Stahl, K.D.: Opiate receptors and their interactions with agonists and antagonists. *Life Sci.* 16, 1795-1800 (1976)
- Stokbroekx, R.A., Vandenberg, J., Van Heertum, A.H.M.T., Van Laar, G.M.L.W.: Synthetic antidiarrheal agents. 2,2-Diphenyl-4-(4-aryl-4-hydroxypiperidine) butyramides. *J. Med. Chem.* 16, 782-786 (1973)
- Sundaresan, P.R., and Rivera-Calimlim, L.: Distribution of chlorpromazine in the gastrointestinal tract of the rat and its effect on absorptive function. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 194, 593-602 (1975)
- Terenius, L.: Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta pharmacol.* 32, 377-384 (1973)

- Terenius, L.: Contribution of "receptor" affinity to analgesic potency. *J. Pharm. Pharmacol.* 26, 146-148 (1974)
- Terenius, L.: Comparison between narcotic "receptors" in the guinea-pig ileum and the rat brain. *Acta pharmacol. Toxicol.* 37, 211-221 (1975)
- Teschemacher, H.J., Opheim, K.E., Cox, B.M., and Goldstein, A.: A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. I. Isolation. *Life Sci.* 16, 1771-1776 (1975)
- Trendelenburg, P.: Physiologische und pharmakologische Versuche über die Dünndarmperistaltik. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 81, 55-129 (1917)
- Van Bever, W., and Lal, H. (ed): Synthetic antidiarrheal drugs. Synthesis - preclinical and clinical pharmacology. M. Dekker, New York (1976)
- Van Bever, W., Schellekens, K., and Nimegeers, C.: Structure - activity relationships. In: Synthetic antidiarrheal drugs. M. Dekker, New York (1976), herausgegeben von W. Van Bever and H. Lal.
- Van Nueten, J.M., Geivers, H., Fontaine, J., and Janssen, P.A.J.: An improved method for studying peristalsis in the isolated guinea-pig ileum. *Arch. Int. Pharmacodyn. Therap.* 203, 411-414 (1973)
- Van Nueten, J.M., Janssen, P.A.J., and Fontaine, J.: Unexpected reversal effects of naloxone on the guinea-pig ileum. *Life Sci.* 18, 803-810 (1976)
- Van Wijngaarden, I., and Soudijn, W.: Difenoxin (R 15 403), the active metabolite of diphenoxylate (R 1132), Part I: The excretion and metabolism in rats of difenoxin, the pharmacologically active metabolite of the anti-diarrheal agent diphenoxylate. *Arzneimittelforsch.* 22, 513-516 (1972)

- Vaughan Williams, E.M., and Streeten, D.H.P.: The action of morphine pethidine, and amidone upon the intestinal motility of conscious dogs. *Brit. J. Pharmacol.* 5, 584-603 (1950)
- Von Cube, B., Teschemacher, H.J., Herz, A., and Rees, R.: Permeation morphinwirkender Substanzen im Gehirn in Abhängigkeit von ihrer Lipoidlöslichkeit nach intravenöser und nach intraventrikulärer Injektion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 265, 455-473 (1970)
- Walsh, C.T., and Levine, R.R.: Studies on the entero-hepatic circulation of morphine in the rat. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 195, 303-310 (1975)
- Way, E.L., and Adler, T.K.: The pharmacologic implications of the fate of morphine and its surrogates. *Pharmacological Review* 12, 383-446 (1960)
- Weinstock, M.: Sites of action of narcotic analgesic drugs - peripheral tissues. In: *Narcotic drugs - Biochemical pharmacology.* ed.: D.H. Clouet Plenum Press, New York, p. 394 (1971)
- Wilson, R, Rogers, M., Pert, C.B., and Snyder, S.: A homologous series of analgesics: Correlation of receptor binding with analgesic potency. *J. Med. Chem.* 18, 240-242 (1975)
- Wüster, M., and Herz, A.: Significance of physico-chemical properties of opiates for in vitro testing. In: *Opiates and endogenous opioid peptides*, ed. H.W. Kosterlitz, Elsevier/North Holland (1976)
- Wüster, M., Schulz, R., and Herz, A.: Opiates compared with antidiarrheals concerning their affinity to the morphine receptor and action on the isolated guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 293 R 35 (1976)

- Wüster, M.: Release of opiate-like substances from the myenteric plexus of the guinea-pig. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 297, R53 (1977)
- Wüster, M., and Herz, A.: Opiate agonist action of antidiarrheal agents in vitro and in vivo - findings in support for selective action. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., im Druck (1977)
- Wüster, M., Lippold, B.C., and Herz, A.: Specific and unspecific receptor interaction of loperamid. In Vorbereitung
- Yamamura, H.I., and Snyder, S.H.: Muscarinic cholinergic receptor binding in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum with ^3H -quinuclidinyl benzilate. Mol. Pharmacol. 10, 861-867 (1974)

Curriculum vitae

23. Juni 1947 : in Berlin geboren als Sohn
des Drogisten Peter Wüster
und seiner Ehefrau Charlotte.
- April 1954 bis
Oktober 1966 : Besuch der Volksschule in
Berlin und des Gymnasiums in
Bad Kreuznach
21. Oktober 1966 : Schulabschluß mit dem Bestehen
der Reifeprüfung
1. Januar 1967 bis
30. Juni 1968 : Wehrdienst, abgeleistet beim
Bundesgrenzschutz in Bonn
1. August 1968 bis
31. Juli 1970 : Apothekerpraktikum in der
Einhorn-Apotheke in Bad Kreuznach
16. Juli 1970 : Bestehen der pharmazeutischen
Vorprüfung
- April 1971 bis
April 1974 : Pharmaziestudium an der
Universität München
14. Mai 1974 : Pharmazeutisches Staatsexamen
- ab Juli 1974 : Ausführung der vorliegenden
Doktorarbeit unter der Anleitung
von Prof. Dr. A. Herz an der
Neuropharmakologischen Abteilung
des Max-Planck-Institutes für
Psychiatrie.

